

TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

(article 18 et règles 43 et 44 du PCT)

Référence du dossier du déposant ou du mandataire BLOjp64441EX	POUR SUITE voir la notification de transmission du rapport de recherche internationale (formulaire PCT/ISA/220) et, le cas échéant, le point 5 ci-après A DONNER	
Demande internationale n° PCT/FR 00/ 00613	Date du dépôt international (jour/mois/année) 14/03/2000	(Date de priorité (la plus ancienne) (jour/mois/année) 15/03/1999
Déposant CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE-CNRS		

Le présent rapport de recherche internationale, établi par l'administration chargée de la recherche internationale, est transmis au déposant conformément à l'article 18. Une copie en est transmise au Bureau international.

Ce rapport de recherche internationale comprend 4 feuilles.

☒ Il est aussi accompagné d'une copie de chaque document relatif à l'état de la technique qui y est cité.

1. Base du rapport

a. En ce qui concerne la **langue**, la recherche internationale a été effectuée sur la base de la demande internationale dans la langue dans laquelle elle a été déposée, sauf indication contraire donnée sous le même point.

☐ la recherche internationale a été effectuée sur la base d'une traduction de la demande internationale remise à l'administration.

b. En ce qui concerne **les séquences de nucléotides ou d'acides aminés** divulguées dans la demande internationale (le cas échéant), la recherche internationale a été effectuée sur la base du listage des séquences :

☒ contenu dans la demande internationale, sous forme écrite.

☒ déposée avec la demande internationale, sous forme déchiffrable par ordinateur.

☐ remis ultérieurement à l'administration, sous forme écrite.

☐ remis ultérieurement à l'administration, sous forme déchiffrable par ordinateur.

☐ La déclaration, selon laquelle le listage des séquences présenté par écrit et fourni ultérieurement ne va pas au-delà de la divulgation faite dans la demande telle que déposée, a été fournie.

☐ La déclaration, selon laquelle les informations enregistrées sous forme déchiffrable par ordinateur sont identiques à celles du listage des séquences présenté par écrit, a été fournie.

2. ☐ Il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (voir le cadre I).

3. ☐ Il y a absence d'unité de l'invention (voir le cadre II).

4. En ce qui concerne le **titre**,

☐ le texte est approuvé tel qu'il a été remis par le déposant.

☒ Le texte a été établi par l'administration et a la teneur suivante:

GRB14 ET LE RECEPTEUR DE L'INSULINE AINSI QUE CRIBLAGE DE NOUVEAUX MEDICAMENTS

5. En ce qui concerne l'**abrégé**,

☒ le texte est approuvé tel qu'il a été remis par le déposant

☐ le texte (reproduit dans le cadre III) a été établi par l'administration conformément à la règle 38.2b). Le déposant peut présenter des observations à l'administration dans un délai d'un mois à compter de la date d'expédition du présent rapport de recherche internationale.

6. La figure **des dessins** à publier avec l'abrégé est la Figure n°

☐ suggérée par le déposant.

☐ parce que le déposant n'a pas suggéré de figure.

☐ parce que cette figure caractérise mieux l'invention.

☐ Aucune des figures n'est à publier.

PCTWORLD INTELLECTUAL PROPERTY ORGANIZATION
International Bureau

INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(51) International Patent Classification: G01N 33/74, G01N 33/566, G01N 33/573	A1	(11) International Publication Number: WO 00/55634 (43) International Publication Date: 21 September 2000 (21.09.2000)
(21) International Application Number: PCT/FR00/00613 (22) International Filing Date: 14 March 2000 (14.03.2000) (30) Priority Data: 99/03159 15 March 1999 (15.03.1999) FR (60) Parent Application or Grant CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE-CNRS [/]; (). BURNOL, Anne-Françoise [/]; (). PERDEREAU, Dominique [/]; (). KASUS-JACOBI, Anne [/]; (). BEREZIAT, Véronique [/]; (). GIRARD, Jean [/]; (). BURNOL, Anne-Françoise [/]; (). PERDEREAU, Dominique [/]; (). KASUS-JACOBI, Anne [/]; (). BEREZIAT, Véronique [/]; (). GIRARD, Jean [/]; (). ORES, Béatrice; ().	Published	
(54) Title: GRB14 AND THE INSULIN RECEPTOR AND SCREENING OF NOVEL MEDICINES (54) Titre: GRB14 ET LE RECEPTEUR DE L'INSULINE AINSI QUE CRIBLAGE DE NOUVEAUX MEDICAMENTS (57) Abstract <p>The invention concerns the use of Grb14 and homologous adapting proteins, as tool for screening molecules designed for the treatment of diseases involving insulin. The invention also concerns a method for detecting molecules capable of modulating the tyrosine kinase activity of the insulin receptor.</p> (57) Abrégé <p>L'invention se rapporte à l'utilisation de la protéine Grb14 et des protéines adaptatrices homologues, comme outil de criblage de molécules destinées au traitement des maladies impliquant l'insuline. L'invention se rapporte également à un procédé de détection des molécules aptes à moduler l'activité tyrosine kinase du récepteur de l'insuline.</p>		

PCT

ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE
Bureau international



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁷ : G01N 33/74, 33/566, 33/573		AI	(11) Numéro de publication internationale: WO 00/55634 (43) Date de publication internationale: 21 septembre 2000 (21.09.00)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR00/00613 (22) Date de dépôt international: 14 mars 2000 (14.03.00) (30) Données relatives à la priorité: 99/03159 15 mars 1999 (15.03.99) FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE-CNRS [FR/FR]; 3, rue Michel Ange, F-75794 Paris Cedex 16 (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): BURNOL, Anne-Françoise [FR/FR]; 52, Grande Rue, F-92310 Sevres (FR). PERDEREAU, Dominique [FR/FR]; 16, rue Henri Tariel, F-92130 Issy Les Moulineaux (FR). KASUS-JACOBI, Anne [FR/FR]; 5 place Louis Durey, F-78180 Montigny Le Bretonneux (FR). BEREZIAT, Véronique [FR/FR]; 24, rue du Hameau des Joncherettes, F-91120 Palaiseau (FR). GIRARD, Jean [FR/FR]; 54, rue Vergniaud, F-75013 Paris (FR). (74) Mandataires: ORES, Béatrice etc.; Cabinet Ores, 6, avenue de Messine, F-75008 Paris (FR).		(81) Etats désignés: AU, CA, JP, NZ, US, ZA, brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale. Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont reçues.</i>	
(54) Title: GRB14 AND THE INSULIN RECEPTOR AND SCREENING OF NOVEL MEDICINES (54) Titre: GRB14 ET LE RECEPTEUR DE L'INSULINE AINSI QUE CRIBLAGE DE NOUVEAUX MEDICAMENTS (57) Abstract The invention concerns the use of Grb14 and homologous adapting proteins, as tool for screening molecules designed for the treatment of diseases involving insulin. The invention also concerns a method for detecting molecules capable of modulating the tyrosine kinase activity of the insulin receptor. (57) Abrégé L'invention se rapporte à l'utilisation de la protéine Grb14 et des protéines adaptatrices homologues, comme outil de criblage de molécules destinées au traitement des maladies impliquant l'insuline. L'invention se rapporte également à un procédé de détection des molécules aptes à moduler l'activité tyrosine kinase du récepteur de l'insuline.			

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Brsil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakhstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		
EE	Estonie						

D scription

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

WO 00/55634

PCT/FR00/00613

GRB14 ET LE RECEPTEUR DE L'INSULINE AINSI QUE CRIBLAGE DE NOUVEAUX MEDICAMENTS

La présente invention se rapporte à l'utilisation de la protéine Grb14 et des protéines adaptatrices homologues (protéines de la famille Grb7), comme outil de criblage de molécules destinées au traitement des maladies impliquant l'insuline.

L'insuline, hormone principale de la régulation du métabolisme énergétique est la seule hormone hypoglycémiante de l'organisme ; elle stimule le transport du glucose et son utilisation par les tissus périphériques (muscles squelettiques et tissu adipeux) et inhibe la production endogène de glucose par le foie.

L'insuline agit par l'intermédiaire d'un récepteur qui est exprimé à la membrane plasmique des cellules. Ce récepteur fait partie de la famille des récepteurs à activité tyrosine kinase, qui sont caractérisés par la présence d'un domaine intracellulaire portant l'activité catalytique. La liaison du ligand induit la dimérisation des récepteurs, l'activation du domaine tyrosine kinase, et la phosphorylation (autophosphorylation et transphosphorylation) de résidus tyrosines spécifiques présents dans la partie cytosolique des récepteurs (Ullrich, A. et al. (1990) *Cell*, 61, 203-212).

Le récepteur de l'insuline possède la particularité d'être présent sous une forme naturellement dimérisée. La liaison de l'insuline à la sous-unité α extracellulaire induit des modifications conformationnelles qui aboutissent à l'activation du domaine kinase porté par la sous-unité β du récepteur, et à son autophosphorylation, nécessaire à l'activation complète du récepteur. Le récepteur de l'insuline ainsi activé phosphoryle des protéines intracellulaires qui servent d'effecteurs du signal de l'insuline.

En effet, la transduction d'un signal à l'intérieur de la cellule après la stimulation d'un récepteur à activité tyrosine kinase, fait appel à des cascades d'interactions protéine-protéine, qui aboutissent à un effet métabolique ou mitogénique, et dans lesquelles les adaptateurs moléculaires ont un rôle privilégié. Par l'intermédiaire de leurs domaines d'interactions protéiques, les adaptateurs permettent le recrutement des effecteurs successifs, constituant les voies de signalisation.

Parmi les différents relais entre le récepteur de l'insuline et ses

5

2

10

15

20

effecteurs intracellulaires, les protéines adaptatrices les mieux caractérisées sont IRS-1, IRS-2 (*Insulin Receptor substrate-1 and 2*) et Shc (*Src and collagen homologous protein*) (White M.F. et al. (1994) *J. Biol. Chem.*, **269**, 1-4 ; Waters S.B. et al. (1996) *Trends Cell Biol.*, **6**, 1-4). Elles ne sont pas spécifiques des tissus sensibles à l'insuline et sont également phosphorylées aussi bien après l'activation d'autres récepteurs à tyrosine kinase qu'après celle de récepteurs de cytokines ou de récepteurs couplés à la protéine G (Bonfini L. et al. (1996) *Trends Biochem. Sci.*, **21**, 257-261 ; Souza S.C. et al. (1994) *J. Biol. Chem.*, **269**, 30085-30088 ; Argetsinger L.S. et al. (1995) *J. Biol. Chem.*, **270**, 14685-14692 ; Platanias L.C. et al. (1996) *J. Biol. Chem.*, **271**, 278-282 ; Velloso L.A. et al. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 12490-12495 ; Kowalski-Chauvel A. et al. (1996) *J. Biol. Chem.*, **271**, 26536-26361).

25

Ainsi par exemple, la protéine Shc se lie au récepteur de l'insuline activé, puis est phosphorylée, et recrute l'adaptateur Grb2 qui se lie au niveau de résidus phosphotyrosine de Shc, par l'intermédiaire de son domaine SH2 et se lie par un domaine SH3 sur l'échangeur nucléotidique Sos, qui lui-même va permettre l'activation de Ras (Schlessinger, J. (1993), *Trends Biochem. Sci.*, **18**, 273-275).

30

Récemment de nouvelles protéines adaptatrices susceptibles d'être impliquées spécifiquement dans la transduction du signal de l'insuline ont été clonées par interaction avec le récepteur de l'insuline en utilisant le système double-hybride, notamment différentes isoformes de la protéine Grb10 de l'homme et de la souris (Liu F. et al. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 10287-10291 ; O'Neill T. J. et al. (1996) *J. Biol. Chem.*, **271**, 22506-22513 ; Frantz J.D. et al. (1997) *J. Biol. Chem.*, **272**, 2659-2667)

35

Plus récemment encore les Inventeurs ont cloné les protéines rGrb14 et rGrb7 chez le rat, par interaction avec le récepteur de l'insuline en utilisant le système double-hybride (Kasus-jacobi et al. (1998) *J. Biol. Chem.*, **273**, 26026-26035).

40

Les protéines mGrb10, hGrb10, hGrb14 et rGrb14 appartiennent à la même famille de protéines adaptatrices dont le premier membre connu est la protéine Grb7 qui se lie au récepteur de l'EGF, du Ret et du PDGF (Margolis B. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 8894-8898). Ci-après les protéines de cette famille sont dénommées protéines de la famille Grb7.

45

Ces protéines qui ont été clonées par interaction avec des récepteurs activés de l'insuline, semblent jouer un rôle important dans la transduction du signal de l'insuline.

50

Ainsi les Inventeurs ont montré que l'expression de la protéine rGrb14

55

5

3

10

est très bien corrélée avec la sensibilité des tissus à l'insuline et que sa surexpression dans des cellules CHO-IR (*Chinese Hamster Ovary* exprimant des taux élevés de récepteurs de l'insuline d'origine humaine) inhibe les effets de l'insuline en diminuant l'activation de IRS-1 sans modifier l'autophosphorylation du récepteur de l'insuline. (Kasus-Jacobi et al. (1998) déjà cité).

5

15

Les protéines adaptatrices de la famille de Grb7 sont caractérisées par la succession de trois domaines :

- une séquence riche en proline appelée PP, près de l'extrémité amino-terminale,

10

- un domaine central appelé PH (*Pleckstrin homology*) et

20

- un domaine appelé SH2 (*Src homology 2*) à l'extrémité carboxy-terminale, connu pour interagir avec les séquences contenant des phosphotyrosines (Ooi J. et al. (1995) *Oncogene*, 10, 1621-1630 ; Margolis B. (1992) déjà cité ; Daly R.J. (1996) déjà cité).

25

15

Outre ces domaines qui ont été déjà bien étudiés dans d'autres protéines, les Inventeurs ont mis en évidence un nouveau domaine sur la protéine rGrb14, appelé PIR (*Phosphorylated Insulin Receptor Interacting Region*) correspondant aux résidus 340 à 437 de la protéine ; par comparaison entre les protéines Grb7, Grb10 et Grb14, les Inventeurs ont montré qu'une séquence de 43 acides aminés correspondant aux acides 365 à 407 de la protéine rGrb14 est hautement conservée dans l'ensemble de la famille de ces protéines (Kasus-Jacobi et al. (1998) déjà cité) et devrait jouer un rôle particulier dans la fixation de ces protéines sur le récepteur de l'insuline.

30

20

35

25

Le domaine PIR est homologue au domaine BPS (*Between PH and SH2*), (Kasus-Jacobi et al. (1998) déjà cité), récemment mis en évidence sur la protéine hGrb10 (He W. et al. (1998) *J. Biol. Chem.*, 273, 6860-6867) et correspond aux acides aminés 358-434 de la protéine Grb14.

40

L'association entre le récepteur de l'insuline activé et les protéines de la famille Grb7 fait intervenir les deux domaines PIR et SH2. En fonction de la protéine Grb considérée, le rôle respectif des deux domaines est plus ou moins important. En effet, c'est essentiellement le PIR qui est responsable de la liaison de Grb14 sur le récepteur de l'insuline (Kasus-Jacobi et al. (1998) déjà cité), alors que le PIR et le SH2 sont impliqués dans l'interaction entre Grb10 et le récepteur (He et al (1998) déjà cité).

45

35

Plusieurs équipes ont montré qu'il y avait des défauts de

50

55

5

4

10

phosphorylation du récepteur de l'insuline ainsi que des altérations des effets de l'insuline sur le transport de glucose et sur l'activation de certaines enzymes chez des patients obèses ou diabétiques (Arner, P. et al., J. N. (1987), *Diabetologia*, 30, 437-440 ; Caro, J. F. et al. (1987), *J. Clin. Invest.*, 79, 1330-1337 ; Mandarino, L. J. (1989), *Diab. Metab. Rev.*, 5, 475-486).

15

Des mutations du gène du récepteur de l'insuline peuvent conduire par différents mécanismes à une diminution de l'activité tyrosine kinase du récepteur, contribuant ainsi au développement d'un état de résistance à l'insuline et à l'instauration de pathologies comme l'obésité et le diabète non-insulino-dépendant (DNID) (Taylor, S. I. (1992), *Diabetes*, 41, 1473-1490).

20

Dans des états de résistance à l'insuline, il y a développement d'une hyperglycémie lorsque la sécrétion endogène d'insuline n'est plus suffisante, et il faut faire appel à une insulinothérapie pour maintenir l'homéostasie glucidique. Après 10 ans d'évolution du diabète, on observe dans 30% des cas des complications sévères.

25

Ces complications, secondaires à un mauvais contrôle de la glycémie, ont de très sérieuses implications cliniques (insuffisances rénales, nécrose et amputation des membres inférieurs, cécité) qui conduisent à un raccourcissement de l'espérance de vie des patients.

30

La normalisation de l'activité tyrosine kinase lorsqu'elle est perturbée peut être envisagée soit directement en utilisant des molécules qui agissent sur cette enzyme (Levitzki et al. (1995), *Science* 267, 1782-1788), soit indirectement en inhibant les interactions entre les protéines adaptatrices et la tyrosine kinase (Pendergast et al. (1993), *Cell*, 75, 175-185).

35

Or, les Inventeurs ont montré, de manière surprenante, que la liaison au récepteur de l'insuline activé, du domaine PIR des protéines de la famille des protéines Grb7 (Grb14, Grb10, et Grb7), seul ou associé au fragment SH2 (PIR-SH2), inhibe l'activité tyrosine kinase dudit récepteur.

40

La présente invention a pour objet l'utilisation d'un fragment constitué par le domaine PIR ou le domaine PIR-SH2 d'une protéine de la famille des protéines Grb7, comme outil de criblage de molécules destinées au traitement des maladies impliquant l'insuline.

45

Selon un mode de réalisation avantageux de ladite utilisation, ledit fragment est sélectionné dans le groupe constitué par les séquences : SEQ ID NO:1-28 qui correspondent respectivement à des fragments PIR (résidus 365-407 et résidus 353-436) et à des fragments PIR-SH2 (résidus 365-538 et résidus 353-538) des

50

55

5

5

protéines rGrb14, hGrb14, mGrb10, hGrb10, rGrb7, hGrb7 et mGrb7).

10

Au sens de la présente invention la numérotation des résidus des fragments de protéines est donnée en référence à la séquence de la protéine rGrb14, après alignement.

5

15

De façon intéressante, les Inventeurs ont montré que l'effet inhibiteur de la protéine Grb14 est reproduit par les protéines de fusion GST-PIR et GST-PIR+SH2 purifiées, obtenues par fusion de la GST avec le domaine PIR ou le domaine PIR+SH2 de rGrb14. En revanche cet effet inhibiteur n'est pas observé avec la protéine de fusion GST-SH2 obtenue par fusion GST avec le domaine SH2 de rGrb14.

10

20

De façon inattendue, les Inventeurs ont montré que le domaine PIR seul a une activité équivalente à celle de la protéine entière alors que le domaine PIR+SH2 a un effet inhibiteur beaucoup plus important que le PIR exprimé seul. En effet l'inhibition totale de l'activité tyrosine kinase des récepteurs de l'insuline est obtenue lorsque l'on ajoute 0,3 µg de protéine GST-PIR, alors qu'il ne faut que 0,03 µg de GST-PIR+SH2. Il semble donc que si le domaine SH2 n'a pas d'activité inhibitrice propre, par contre il potentialise fortement l'effet du PIR.

25

15

30

20

De façon comparable, les Inventeurs ont montré que les domaines PIR et PIR+SH2 de Grb10 ont un effet inhibiteur sur l'activité tyrosine kinase du récepteur de l'insuline. Le domaine SH2 de Grb10 n'a pas en lui-même d'effet inhibiteur, mais il potentialise également l'inhibition induite par le PIR.

35

25

40

30

45

De plus, les Inventeurs ont montré que le récepteur de l'insuline est plus sensible à l'effet inhibiteur de Grb14 qu'à celui de Grb10 et de Grb7, et que l'effet peut être obtenu aussi bien avec la protéine entière qu'avec le domaine PIR ou le domaine PIR-SH2.

Les domaines PIR et PIR-SH2 des protéines Grb14, Grb10 et Grb7 se comportent donc comme des inhibiteurs endogènes de l'activité tyrosine kinase du récepteur de l'insuline, ce qui est une fonction tout à fait nouvelle pour des adaptateurs moléculaires. En effet, contrairement aux protéines adaptatrices IRS-1, IRS-2 ou Shc qui sont des intermédiaires entre le récepteur de l'insuline et des effecteurs cellulaires, lesdits domaines des protéines de la famille Grb7 agissent directement sur l'activité tyrosine kinase du récepteur de l'insuline.

En conséquence, les domaines PIR et PIR-SH2 de la protéine Grb14 et des protéines adaptatrices homologues (protéines de la famille Grb7) constituent des cibles potentielles pour des médicaments.

50

35

En effet, des composés qui sont susceptibles d'augmenter ou de

55

5

6

10

supprimer les interactions des domaines desdites protéines pourraient prévenir ou guérir les troubles de l'organisme liés à une modification de l'activité de la protéine kinase du récepteur de l'insuline.

15

En conséquence, la présente invention se rapporte donc également à un procédé de détection de molécules aptes à stimuler ou inhiber (moduler) l'activité tyrosine kinase du récepteur de l'insuline, caractérisé en ce qu'il comprend :

20

a) la mise en contact du récepteur de l'insuline activé avec un fragment constitué par le domaine PIR ou le domaine PIR-SH2 d'une protéine de la famille des protéines Grb7, et la molécule à tester, dans des conditions permettant la formation d'une liaison entre ledit récepteur et ledit fragment,

25

b) l'addition d'un substrat de la tyrosine kinase,
c) la mesure de l'activité tyrosine kinase, et
d) la détermination de la modulation (inhibition ou stimulation) de l'activité tyrosine kinase par comparaison avec un contrôle constitué par le récepteur de l'insuline activé et ledit fragment.

30

Conformément à l'invention, ledit fragment est de préférence sélectionné dans le groupe constitué par les séquences SEQ ID NO:1 à 28.

Selon un mode de mise en œuvre avantageux dudit procédé, préalablement à l'étape a) ci-dessus, une présélection des molécules aptes à stimuler ou inhiber (moduler) les interactions d'un fragment constitué par le domaine PIR ou le domaine PIR-SH2 d'une protéine de la famille des protéines Grb7 avec le récepteur de l'insuline, est réalisée par :

35

1) l'immobilisation dudit fragment sur un support solide,
2) la mise en contact de la molécule à tester avec ledit fragment, puis
3) l'incubation avec le récepteur de l'insuline marqué et préalablement activé, dans des conditions permettant la formation d'une liaison entre ledit récepteur et ledit fragment,

40

4) la séparation du récepteur marqué non retenu sur le support,
5) la détection du complexe éventuellement formé entre ledit fragment et le récepteur de l'insuline activé, et
6) la détermination de l'effet de la molécule (inhibition ou stimulation de l'interaction fragment-récepteur), par comparaison avec un contrôle comprenant ledit fragment et le récepteur de l'insuline.

45

50

Pour permettre l'immobilisation dudit fragment sur un support solide, ledit fragment peut par exemple être exprimé en fusion avec une protéine telle que la

55

5

7

GST.

10

Ledit récepteur peut par exemple être marqué avec une molécule radioactive, ou fusionné à une protéine fluorescente telle que la GFP (*Green Fluorescent Protein*).

15

5 Lorsque ledit récepteur est marqué avec une molécule fluorescente ou radioactive, l'interaction entre ledit fragment et ledit récepteur est détectée par lecture de la fluorescence ou de la radioactivité retenue sur le support solide.

20

La présente invention a également pour objet l'utilisation d'une molécule apte à se lier à un fragment constitué par le domaine PIR ou le domaine PIR-SH2 d'une protéine de la famille des protéines Grb7 et à inhiber l'activité tyrosine kinase du récepteur de l'insuline, pour la fabrication d'un médicament utile dans le traitement des maladies impliquant l'insuline, notamment le diabète et l'obésité.

25

Selon un mode de réalisation avantageux de ladite utilisation, ladite molécule est obtenue par le procédé conforme à l'invention.

30

15 Les composés ainsi sélectionnés sont potentiellement utiles pour prévenir ou traiter des maladies impliquant l'insuline comme par exemple le diabète et l'obésité ou d'autres pathologies caractérisées par une résistance à l'insuline telles que l'ovaire polycystique (Legro, R. S. et al. (1998), *Rec. Progr. Hormone Res.*, **53**, 217-255) ou le syndrome X (Komers, R. et al. (1998), *Physiol. Res.*, **47**, 215-225).

35

20 Outre les dispositions qui précèdent, l'invention comprend encore d'autres dispositions, qui ressortiront de la description qui va suivre, qui se réfère à des exemples de mise en œuvre du procédé objet de la présente invention ainsi qu'aux dessins annexés, dans lesquels :

40

- la figure 1 illustre l'alignement des protéines de la famille des protéines Grbs. Les pourcentages d'identité en acides aminés des domaines sont exprimés par rapport au domaine homologue de rGrb14. PP : motif riche en résidus proline, site de liaison de protéines contenant des domaines SH3 ; PH : domaine d'homologie avec la plexstrine, association avec des phospholipides ou des protéines ; PIR, *phosphorylated insulin receptor interacting region* ; SH2, domaine permettant une interaction avec des résidus phosphotyrosines.

45

- la figure 2 illustre l'alignement des séquences des domaines PIR des protéines de la famille des protéines Grb : rGrb14, hGrb14, hGrb10 et hGrb7. La numérotation des acides aminés est donnée en référence à la séquence de la protéine rGrb14. Les acides aminés conservés sont indiqués par un astérisque. Le domaine conservé correspondant aux résidus 365-407 des protéines Grb est grisé.

50

55

5

8

10

- la figure 3 illustre la séquence des domaines PIR-SH2 des protéines de la famille des protéines Grb : rGrb14, hGrb10 et hGrb7. La séquence complète du domaine PIR-SH2 (résidus 353-538) de rGrb14 (SEQ ID NO:4), hGrb10 (SEQ ID NO:16) et hGrb7 (SEQ ID NO:24) est présentée. La séquence du fragment 405-538 du domaine PIR-SH2 de rGrb14 (SEQ ID NO:3), hGrb10 (SEQ ID NO:15) et de hGrb7 (SEQ ID NO:23) est soulignée.

15

- la figure 4 illustre l'effet des protéines Grbs sur l'activité tyrosine kinase des récepteurs de l'insuline; (●) GST-rGrb14 ; (▲) GST-mGrb10 ; (■) GST-rGrb7. Les résultats sont exprimés en pourcentage de la valeur obtenue en l'absence de protéine ajoutée. Nombre d'expériences = 4. Les effets des protéines GST-mGrb10 et GST-rGrb7 comparés avec ceux de la protéine GST-rGrb14 montrent des différences statistiquement significatives, indiquées par: * pour $p < 0,05$, ** pour $p < 0,01$ et *** pour $p < 0,001$.

20

25

- la figure 5 illustre l'inhibition de la tyrosine kinase des récepteurs de l'insuline par la protéine rGrb14 : (●) GST-rGrb14 ; (▲) GST-PIR de rGrb14 ; (⊗) GST-SH2 de rGrb14; (■) GST-PIR+SH2 de rGrb14 ; (◇) GST-PIR+SH2 R464K de rGrb14. Les résultats sont exprimés en pourcentage de la valeur obtenue en l'absence de protéine ajoutée. Nombre d'expériences = 5. Les effets des différentes constructions de rGrb14 comparés avec ceux de la protéine GST-rGrb14 entière montrent des différences statistiquement significatives, indiquées par: * pour $p < 0,05$, ** pour $p < 0,01$ et *** pour $p < 0,001$.

30

35

- la figure 6 illustre l'inhibition de l'activité tyrosine kinase des récepteurs de l'insuline par les différents domaines de mGrb10 : (●) GST-mGrb10 ; (▲) GST-PIR de mGrb10 ; (⊗) GST-SH2 de mGrb10 ; (■) GST-PIR+SH2 de mGrb10 ; (◇) GST-PIR+SH2 R547K de mGrb10. Les résultats sont exprimés en pourcentage de la valeur obtenue en l'absence de protéine ajoutée. Nombre d'expériences = 4. Les effets des différentes constructions de mGrb10 comparés avec ceux de la protéine GST-mGrb10 entière montrent des différences statistiquement significatives, indiquées par: * pour $p < 0,05$, ** pour $p < 0,01$ et *** pour $p < 0,001$.

40

45

- la figure 7 illustre l'inhibition de l'activité tyrosine kinase des récepteurs de l'insuline par les différents domaines de rGrb7: (●) GST-rGrb7; (▲) GST-PIR de rGrb7; (⊗) GST-SH2 de rGrb7 ; (■) GST-PIR+SH2 de rGrb7. Les résultats sont exprimés en pourcentage de la valeur obtenue en absence de protéine ajoutée. Nombre d'expériences= 2. Les effets des différentes constructions de rGrb7 comparés avec ceux de la protéine GST-rGrb7 entière montrent des différences

50

55

5

9

statistiquement significatives, indiquées par: * pour $p < 0,05$, ** pour $p < 0,01$ et *** pour $p < 0,001$.

10

Exemple 1 : Comparaison de l'effet des protéines rGrb14, mGrb10 et rGrb7 sur l'activité tyrosine kinase des récepteurs de l'insuline

5

1. Mode opératoire:

15

Des récepteurs de l'insuline sont partiellement purifiés à partir de cellules CHO-IR, en passant un lysat cellulaire sur une colonne de lectine de germe de blé et en éluant les glycoprotéines retenues avec de la N-acétylglucosamine 0,3M. Les récepteurs de l'insuline ainsi purifiés sont incubés en présence d'insuline (0 ou 10^{-7} M) pendant 1 heure à température ambiante. On ajoute alors un tampon contenant de l'ATP $20 \mu\text{M}$, des ions MnCl_2 et MgCl_2 et du $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP pour permettre aux récepteurs de s'autophosphoryler, et des quantités croissantes des protéines Grbs purifiées exprimées en fusion avec la GST. 30 minutes après, on ajoute $15 \mu\text{g}$ d'un substrat de synthèse, le poly Glu-Tyr (4:1). L'activité tyrosine kinase des récepteurs est mesurée par l'incorporation de radioactivité dans le poly Glu-Tyr pendant 30 min.

25

15

2. Résultats:

Ils sont représentés à la figure 4.

30

L'addition des protéines de fusion GST-rGrb14 et GST-mGrb10 induit une inhibition dose-dépendante de l'activité tyrosine kinase des récepteurs de l'insuline, et les concentrations les plus élevées permettent une inhibition totale de l'enzyme. Par comparaison, la protéine GST-rGrb7 ne permet au maximum qu'une inhibition de 40%. La courbe dose-réponse de l'effet de GST-mGrb10 est déplacée sur la droite par rapport à la courbe de l'effet de GST-rGrb14. Une inhibition de 50% de l'activité tyrosine kinase des récepteurs est obtenue en utilisant respectivement $0,04 \mu\text{g}$ de GST-rGrb14 et $0,13 \mu\text{g}$ de GST-mGrb10. L'activité tyrosine kinase des récepteurs de l'insuline est donc plus sensible à l'effet inhibiteur de rGrb14 qu'à celui de mGrb10.

40

Ces résultats montrent que les protéines Grbs ont une activité inhibitrice sur l'activité tyrosine kinase des récepteurs de l'insuline, et que la protéine rGrb14 a l'effet inhibiteur le plus important.

45

Exemple 2 : Effet inhibiteur des différents domaines de rGrb14 sur l'activité tyrosine kinase des récepteurs de l'insuline

1. Mode opératoire:

50

Les récepteurs de l'insuline sont partiellement purifiés comme décrit dans l'exemple 1. Les différents domaines de rGrb14 (rGrb14, PIR, SH2, PIR+SH2,

55

5

10

10

PIR+SH2 R464K) sont produits en fusion avec la GST et purifiés. L'effet inhibiteur de ces protéines sur l'activité tyrosine kinase des récepteurs de l'insuline est analysé comme décrit dans l'exemple 1.

2. Résultats:

5

Ils sont représentés à la figure 5.

15

Le domaine PIR exerce un effet inhibiteur comparable à celui de la protéine rGrb14 entière, alors que le domaine SH2 n'a aucun effet (de même que la protéine délétée des régions PIR+SH2, résultats non montrés). Cependant, le domaine PIR+SH2 a un effet inhibiteur beaucoup plus important que le PIR seul ou la protéine entière (l'effet inhibiteur maximal est obtenu en ajoutant 0,03 µg de protéine). Cette potentialisation est supprimée par la mutation du résidu arginine 464 du motif FLVRES conservé qui inactive le domaine SH2, puisque le domaine PIR+SH2 R464K a le même effet que le PIR seul.

20

Ces résultats montrent que l'effet inhibiteur de rGrb14 sur l'activité tyrosine kinase des récepteurs de l'insuline est due à la présence du PIR. Le domaine SH2 seul n'a aucun effet, mais il potentialise l'effet du PIR.

25

Exemple 3 : Effet inhibiteur des différents domaines de mGrb10 sur l'activité tyrosine kinase des récepteurs de l'insuline

30

1. Mode opératoire:

20

Le mode opératoire est identique à celui décrit dans l'exemple 2.

2. Résultats:

Ils sont représentés à la figure 6.

35

Le domaine PIR exerce un effet inhibiteur comparable à celui exercé par la protéine entière. Le domaine SH2 seul n'a pas d'action inhibitrice, mais il potentialise l'inhibition exercée par le PIR (la courbe dose-réponse du PIR+SH2 est décalée vers la gauche). La mutation du résidu arginine du motif FLNRDS du domaine SH2 inhibe l'effet potentialisateur du domaine PIR+SH2 (mutant PIR+SH2 R547K).

40

Ces résultats montrent que les domaines PIR ou PIR-SH2 de rGrb14 ont un effet inhibiteur plus important que les domaines PIR ou PIR-SH2 de mGrb10.

Exemple 4 : Effet inhibiteur des différents domaines de rGrb7 sur l'activité tyrosine kinase des récepteurs de l'insuline

45

1. Mode opératoire:

Le mode opératoire est identique à celui décrit à l'exemple 2.

2. Résultats:

50

35

Ils sont représentés à la figure 7.

55

5

11

10

Le domaine PIR exerce un effet inhibiteur comparable à celui exercé par la protéine entière. Le domaine SH2 seul n'a pas d'action inhibitrice, mais il potentialise l'inhibition exercée par le PIR (la courbe dose-réponse du PIR+SH2 est décalée vers la gauche). Les domaines PIR et PIR-SH2 de rGrb7 ont un effet inhibiteur moindre comparé à celui des domaines PIR et PIR-SH2 des protéines rGrb14 et mGrb10.

15

Ainsi que cela ressort de ce qui précède, l'invention ne se limite nullement à ceux de ses modes de mise en œuvre, de réalisation et d'application qui viennent d'être décrits de façon plus explicite ; elle en embrasse au contraire toutes les variantes qui peuvent venir à l'esprit du technicien en la matière, sans s'écarter du cadre, ni de la portée de la présente invention.

20

25

30

35

40

45

50

55

Claims

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

REVENDECATIONS

1. Utilisation d'un fragment constitué par le domaine PIR ou le domaine PIR-SH2 d'une protéine de la famille des protéines Grb7, comme outil de criblage de molécules destinées au traitement des maladies impliquant l'insuline.

2. Utilisation selon la revendication 1, caractérisée en ce que ledit fragment est sélectionné dans le groupe constitué par les séquences SEQ ID NO:1-28.

3. Procédé de détection de molécules aptes à moduler l'activité tyrosine kinase du récepteur de l'insuline, caractérisé en ce qu'il comprend :

a) la mise en contact du récepteur de l'insuline activé avec un fragment constitué par le domaine PIR ou le domaine PIR-SH2 d'une protéine de la famille des protéines Grb7, et la molécule à tester, dans des conditions permettant la formation d'une liaison entre ledit récepteur et ledit fragment,

b) l'addition d'un substrat de la tyrosine kinase,

c) la mesure de l'activité tyrosine kinase, et

d) la détermination de la modulation de l'activité tyrosine kinase par comparaison avec un contrôle constitué par le récepteur de l'insuline activé et ledit fragment.

4. Procédé selon la revendication 3, caractérisé en ce que ledit fragment est sélectionné dans le groupe constitué par les SEQ ID NO:1 à SEQ ID NO:28.

5. Procédé selon la revendication 3 ou la revendication 4, caractérisé en ce que préalablement à l'étape a), une présélection des molécules aptes à moduler les interactions d'un fragment constitué par le domaine PIR ou le domaine PIR-SH2 d'une protéine de la famille des protéines Grb7 avec le récepteur de l'insuline, est réalisée par :

1) l'immobilisation dudit fragment sur un support solide,

2) la mise en contact de la molécule à tester avec ledit fragment, puis

3) l'incubation avec le récepteur de l'insuline marqué et préalablement activé, dans des conditions permettant la formation d'une liaison entre ledit récepteur et ledit fragment,

4) la séparation du récepteur marqué non retenu sur le support,

5) la détection du complexe éventuellement formé entre ledit fragment et le récepteur de l'insuline activé et

6) la détermination de l'effet de la molécule, par comparaison avec un contrôle comprenant ledit fragment et le récepteur de l'insuline.

6. Utilisation d'une molécule apte à se lier à un fragment constitué par

5

13

10

le domaine PIR ou le domaine PIR-SH2 d'une protéine de la famille des protéines Grb7 et à inhiber l'activité tyrosine kinase du récepteur de l'insuline, pour la fabrication d'un médicament utile dans le traitement des maladies impliquant l'insuline.

5

7. Utilisation selon la revendication 6, caractérisée en ce que ladite molécule est obtenue par le procédé selon l'une quelconque des revendications 3 à 5.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

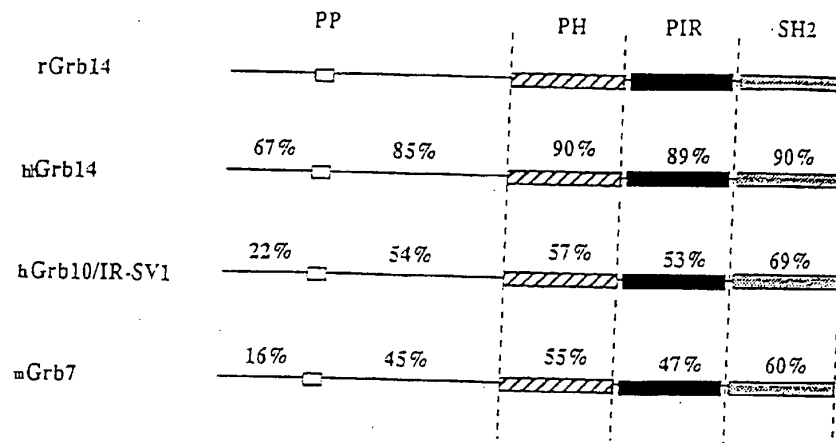


FIG. 1

365 353 QARSACSSQS-VSPMUSVSNISVADISQIRVDITTAISVYVEGLAHKRGCLRLGHIGSPTAPSSQSSAVHNAIHSQP 436
 hgrb14 353 QGRSCSSQS-ISAHIAHDSQGSVIEPTENISVYVEGLAHKRGCLRLGHIGSPTAPSSQSSAVHNAIHSQP
 hgrb10/tn-sv1 353 QGRKALISPF-STVYISVDEHSIVANDSCGGRVIEKADQADAEGLAHKRGCLRLGHIGSPTAPSSQSSAVHNAIHSQP
 hgrb7 354 -SRUIHPSCLGSUPILASDITVANDSGIGROTPILENSVYVEGLAHKRGCLRLGHIGSPTAPSSQSSAVHNAIHSQP
 A * A A A

2/7

FIG. 2

Domaines PIR-SH2:

rGrb14

QARSACSSQSVSPMRSSVSENSLVAMDFSGQKTRVIDNPTTEALSVAVEEGLAWRKKGCL
LRLGNHGSPTAPSSQSSAVNMALHRSQPPWFHRIISRDEAQQLITRQGPVDDGVFLVRDS
QSNPRTTFVLSMSHGQKIKHFQIIPVEDDGEVPHITLDDGHTKFTDLIQLVVEFYQLNKG
VLPCKLKHVCARMMAV

hGrb10

QQRKALLSPFSTPVRSVSENSLVAMDFSGQTGRVIENTPAEAQSAALEEGHAWRKIRST
RMNILLGSQSPHPSTLSTVIHRTQHWFHGRFSREESHRIYKQQLVDDGLFLLRDSQS
NPKAFVLTLCCHHQKIKNFQILPCEDDGQTFFSLDDGNTKFSDLIQLVDFYQLNKGVL
PCKLKHHCIRVAL

hGrb7

SRHLHPSCLGSPPLRSASDNTLVAMDFSGHAGRVIENTPREALSVALEEAQAARKKTN
HRLSLPMPASGTSLSAAIHRTQLWPHGRISREESQRLIGQQLVDDGLFLVRESQRNP
QGFVLSLCHLQKVKHYLILPSEEEGRLYFSMDDGQTRFTDLLQLVDFHQLNRGICLL
RHCCTRVAL

FIGURE 3

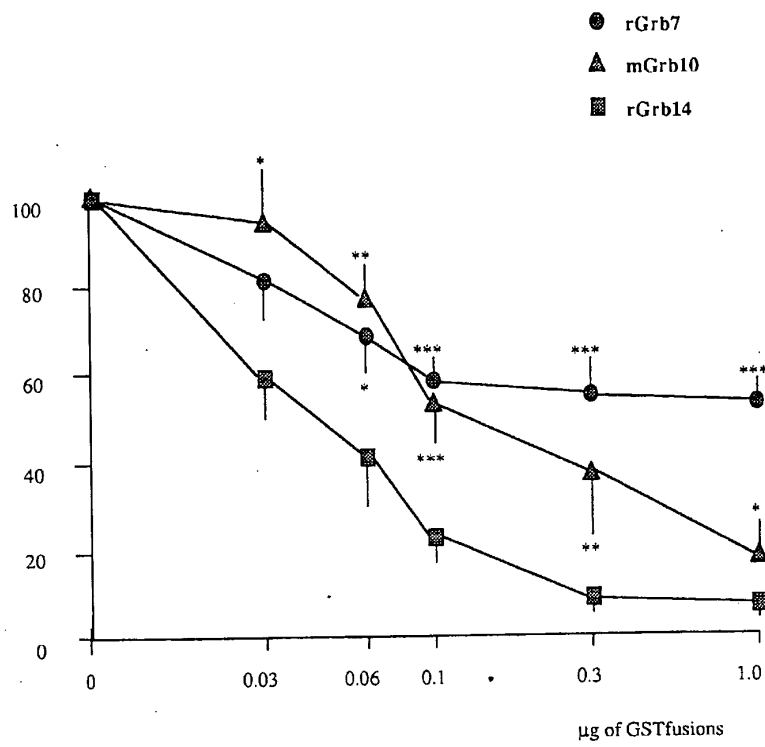


Figure 4

5/7

- rGrb14
- ▲ PIR
- ✱ SH2
- PIR-SH2
- ◇ PIR-SH2 R464K

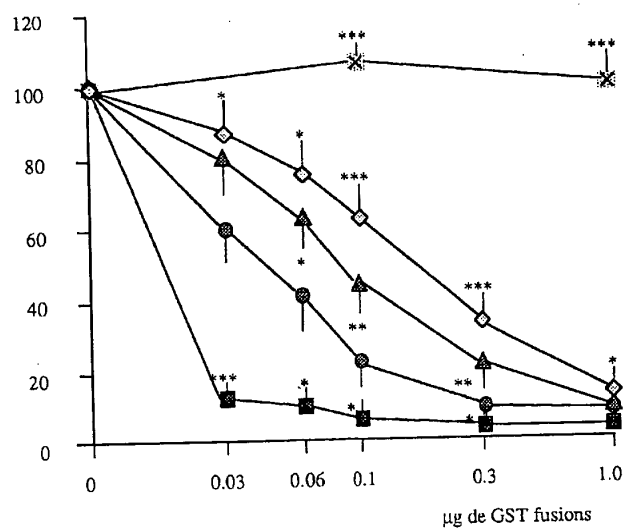


Figure 5

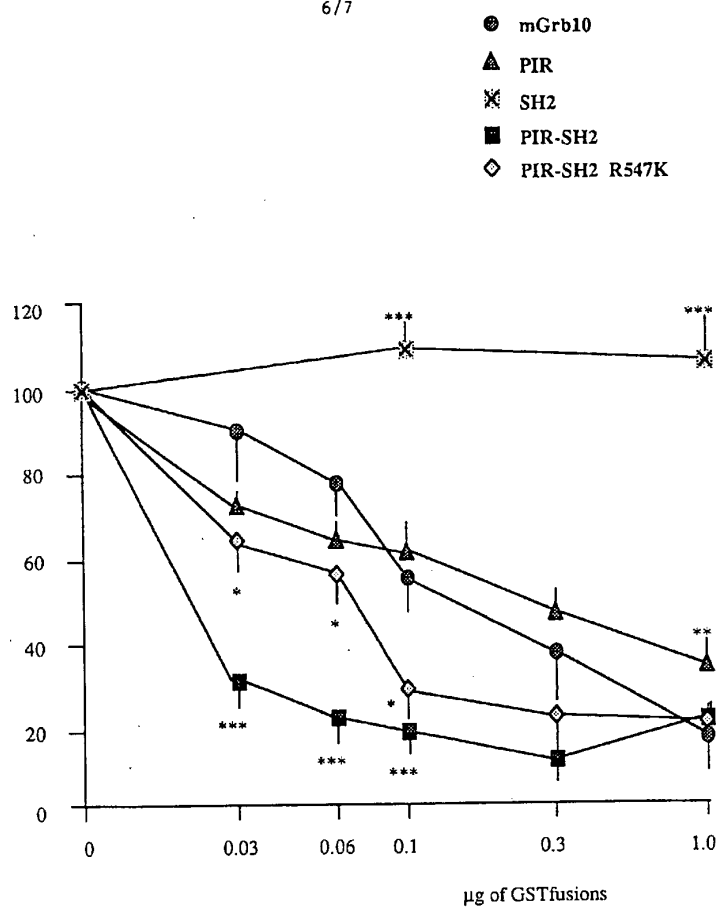


Figure 6

7/7

- rGrb7
- ▲ PIR
- ⊠ SH2
- PIR-SH2

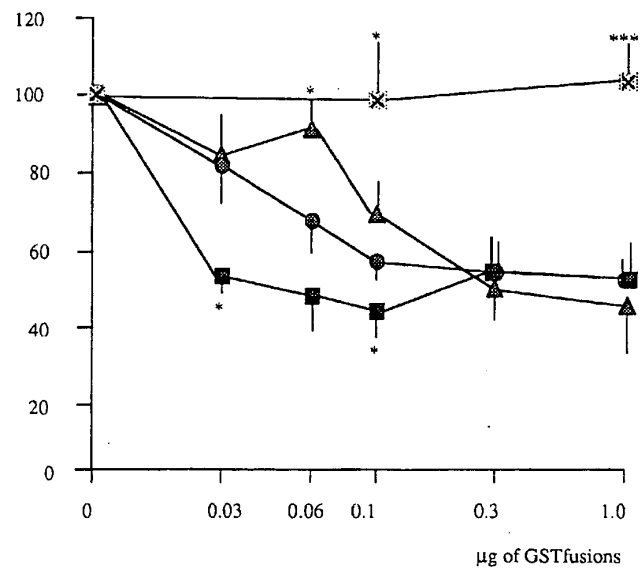


Figure 7

LISTE DE SEQUENCES

<110> BURNOL, ANNE-FRANCOISE
 PERDEREAU, DOMINIQUE
 KASUS-JACOBI, ANNE
 BEREZIAT, VERONIQUE
 GIRARD, JEAN
 CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

<120> UTILISATION DE LA PROTEINE Grb14 ET DES PROTEINES
 ADAPTATRICES HOMOLOGUES COMME OUTIL DE CRIBLAGE DE
 MOLECULES DESTINEES AU TRAITEMENT DES MALADIES IMPLIQUANT
 L'INSULINE

<130> 64441EXT

<140>
 <141>

<160> 28

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1
 <211> 43
 <212> PRT
 <213> Rattus sp.

<400> 1
 Pro Met Arg Ser Val Ser Glu Asn Ser Leu Val Ala Met Asp Phe Ser
 1 5 10 15
 Gly Gln Lys Thr Arg Val Ile Asp Asn Pro Thr Glu Ala Leu Ser Val
 20 25 30
 Ala Val Glu Glu Gly Leu Ala Trp Arg Lys Lys
 35 40

<210> 2
 <211> 84
 <212> PRT
 <213> Rattus sp.

<400> 2
 Gln Ala Arg Ser Ala Cys Ser Ser Gln Ser Val Ser Pro Met Arg Ser
 1 5 10 15
 Val Ser Glu Asn Ser Leu Val Ala Met Asp Phe Ser Gly Gln Lys Thr
 20 25 30
 Arg Val Ile Asp Asn Pro Thr Glu Ala Leu Ser Val Ala Val Glu Glu
 35 40 45
 Gly Leu Ala Trp Arg Lys Lys Gly Cys Leu Arg Leu Gly Asn His Gly
 50 55 60

2

Ser Pro Thr Ala Pro Ser Gln Ser Ser Ala Val Asn Met Ala Leu His
 65 70 75 80

Arg Ser Gln Pro

<210> 3
 <211> 174
 <212> PRT
 <213> Rattus sp.

<400> 3
 Pro Met Arg Ser Val Ser Glu Asn Ser Leu Val Ala Met Asp Phe Ser
 1 5 10 15
 Gly Gln Lys Thr Arg Val Ile Asp Asn Pro Thr Glu Ala Leu Ser Val
 20 25 30
 Ala Val Glu Glu Gly Leu Ala Trp Arg Lys Lys Gly Cys Leu Arg Leu
 35 40 45
 Gly Asn His Gly Ser Pro Thr Ala Pro Ser Gln Ser Ser Ala Val Asn
 50 55 60
 Met Ala Leu His Arg Ser Gln Pro Trp Phe His His Arg Ile Ser Arg
 65 70 75 80
 Asp Glu Ala Gln Gln Leu Ile Thr Arg Gln Gly Pro Val Asp Gly Val
 85 90 95
 Phe Leu Val Arg Asp Ser Gln Ser Asn Pro Arg Thr Phe Val Leu Ser
 100 105 110
 Met Ser His Gly Gln Lys Ile Lys His Phe Gln Ile Ile Pro Val Glu
 115 120 125
 Asp Asp Gly Glu Val Phe His Thr Leu Asp Asp Gly His Thr Lys Phe
 130 135 140
 Thr Asp Leu Ile Gln Leu Val Glu Phe Tyr Gln Leu Asn Lys Gly Val
 145 150 155 160
 Leu Pro Cys Lys Leu Lys His Tyr Cys Ala Arg Met Ala Val
 165 170

<210> 4
 <211> 186
 <212> PRT
 <213> Rattus sp.

<400> 4
 Gln Ala Arg Ser Ala Cys Ser Ser Gln Ser Val Ser Pro Met Arg Ser
 1 5 10 15

3

Val Ser Glu Asn Ser Leu Val Ala Met Asp Phe Ser Gly Gln Lys Thr
 20 25 30
 Arg Val Ile Asp Asn Pro Thr Glu Ala Leu Ser Val Ala Val Glu Glu
 35 40 45
 Gly Leu Ala Trp Arg Lys Lys Gly Cys Leu Arg Leu Gly Asn His Gly
 50 55 60
 Ser Pro Thr Ala Pro Ser Gln Ser Ser Ala Val Asn Met Ala Leu His
 65 70 75 80
 Arg Ser Gln Pro Trp Phe His His Arg Ile Ser Arg Asp Glu Ala Gln
 85 90 95
 Gln Leu Ile Thr Arg Gln Gly Pro Val Asp Gly Val Phe Leu Val Arg
 100 105 110
 Asp Ser Gln Ser Asn Pro Arg Thr Phe Val Leu Ser Met Ser His Gly
 115 120 125
 Gln Lys Ile Lys His Phe Gln Ile Ile Pro Val Glu Asp Asp Gly Glu
 130 135 140
 Val Phe His Thr Leu Asp Asp Gly His Thr Lys Phe Thr Asp Leu Ile
 145 150 155 160
 Gln Leu Val Glu Phe Tyr Gln Leu Asn Lys Gly Val Leu Pro Cys Lys
 165 170 175
 Leu Lys His Tyr Cys Ala Arg Met Ala Val
 180 185

<210> 5
 <211> 43
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 5
 Pro Met Arg Ser Ile Ser Glu Asn Ser Leu Val Ala Met Asp Phe Ser
 1 5 10 15
 Gly Gln Lys Ser Arg Val Ile Glu Asn Pro Thr Glu Ala Leu Ser Val
 20 25 30
 Ala Val Glu Glu Gly Leu Ala Trp Arg Lys Lys
 35 40

<210> 6
 <211> 84
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 6

4

Gln Gly Arg Ser Gly Cys Ser Ser Gln Ser Ile Ser Pro Met Arg Ser
 1 5 10 15
 Ile Ser Glu Asn Ser Leu Val Ala Met Asp Phe Ser Gly Gln Lys Ser
 20 25 30
 Arg Val Ile Glu Asn Pro Thr Glu Ala Leu Ser Val Ala Val Glu Glu
 35 40 45
 Gly Leu Ala Trp Arg Lys Lys Gly Cys Leu Arg Leu Gly Thr His Gly
 50 55 60
 Ser Pro Thr Ala Ser Ser Gln Ser Ser Ala Thr Asn Met Ala Ile His
 65 70 75 80
 Arg Ser Gln Pro

<210> 7
 <211> 174
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 7
 Pro Met Arg Ser Ile Ser Glu Asn Ser Leu Val Ala Met Asp Phe Ser
 1 5 10 15
 Gly Gln Lys Ser Arg Val Ile Glu Asn Pro Thr Glu Ala Leu Ser Val
 20 25 30
 Ala Val Glu Glu Gly Leu Ala Trp Arg Lys Lys Gly Cys Leu Arg Leu
 35 40 45
 Gly Thr His Gly Ser Pro Thr Ala Ser Ser Gln Ser Ser Ala Thr Asn
 50 55 60
 Met Ala Ile His Arg Ser Gln Pro Trp Phe His His Lys Ile Ser Arg
 65 70 75 80
 Asp Glu Ala Gln Arg Leu Ile Ile Gln Gln Gly Leu Val Asp Gly Val
 85 90 95
 Phe Leu Val Arg Asp Ser Gln Ser Asn Pro Lys Thr Phe Val Leu Ser
 100 105 110
 Met Ser His Gly Gln Lys Ile Lys His Phe Gln Ile Ile Pro Val Glu
 115 120 125
 Asp Asp Gly Glu Met Phe His Thr Leu Asp Asp Gly His Thr Arg Phe
 130 135 140
 Thr Asp Leu Ile Gln Leu Val Glu Phe Tyr Gln Leu Asn Lys Gly Val
 145 150 155 160
 Leu Pro Cys Lys Leu Lys His Tyr Cys Ala Arg Ile Ala Leu
 165 170

<210> 8
 <211> 186
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 8
 Gln Gly Arg Ser Gly Cys Ser Ser Gln Ser Ile Ser Pro Met Arg Ser
 1 5 10 15
 Ile Ser Glu Asn Ser Leu Val Ala Met Asp Phe Ser Gly Gln Lys Ser
 20 25 30
 Arg Val Ile Glu Asn Pro Thr Glu Ala Leu Ser Val Ala Val Glu Glu
 35 40 45
 Gly Leu Ala Trp Arg Lys Lys Gly Cys Leu Arg Leu Gly Thr His Gly
 50 55 60
 Ser Pro Thr Ala Ser Ser Gln Ser Ser Ala Thr Asn Met Ala Ile His
 65 70 75 80
 Arg Ser Gln Pro Trp Phe His His Lys Ile Ser Arg Asp Glu Ala Gln
 85 90 95
 Arg Leu Ile Ile Gln Gln Gly Leu Val Asp Gly Val Phe Leu Val Arg
 100 105 110
 Asp Ser Gln Ser Asn Pro Lys Thr Phe Val Leu Ser Met Ser His Gly
 115 120 125
 Gln Lys Ile Lys His Phe Gln Ile Ile Pro Val Glu Asp Asp Gly Glu
 130 135 140
 Met Phe His Thr Leu Asp Asp Gly His Thr Arg Phe Thr Asp Leu Ile
 145 150 155 160
 Gln Leu Val Glu Phe Tyr Gln Leu Asn Lys Gly Val Leu Pro Cys Lys
 165 170 175
 Leu Lys His Tyr Cys Ala Arg Ile Ala Leu
 180 185

<210> 9
 <211> 43
 <212> PRT
 <213> mus muris

<400> 9
 Pro Met Arg Ser Val Ser Glu Asn Ser Leu Val Ala Met Asp Phe Ser
 1 5 10 15
 Gly Gln Ile Gly Arg Val Ile Asp Asn Pro Ala Glu Ala Gln Ser Ala
 20 25 30

Ala Leu Glu Glu Gly His Ala Trp Arg Asn Gly
 35 40

<210> 10
 <211> 82
 <212> PRT
 <213> mus muris

<400> 10
 Pro Gln Arg Lys Gly Leu Pro Pro Pro Phe Asn Ala Pro Met Arg Ser
 1 5 10 15
 Val Ser Glu Asn Ser Leu Val Ala Met Asp Phe Ser Gly Gln Ile Gly
 20 25 30
 Arg Val Ile Asp Asn Pro Ala Glu Ala Gln Ser Ala Ala Leu Glu Glu
 35 40 45
 Gly His Ala Trp Arg Asn Gly Ser Thr Arg Met Asn Ile Leu Ser Ser
 50 55 60
 Gln Ser Pro Leu His Pro Ser Thr Leu Asn Ala Val Ile His Arg Thr
 65 70 75 80
 Gln His

<210> 11
 <211> 172
 <212> PRT
 <213> mus muris

<400> 11
 Pro Met Arg Ser Val Ser Glu Asn Ser Leu Val Ala Met Asp Phe Ser
 1 5 10 15
 Gly Gln Ile Gly Arg Val Ile Asp Asn Pro Ala Glu Ala Gln Ser Ala
 20 25 30
 Ala Leu Glu Glu Gly His Ala Trp Arg Asn Gly Ser Thr Arg Met Asn
 35 40 45
 Ile Leu Ser Ser Gln Ser Pro Leu His Pro Ser Thr Leu Asn Ala Val
 50 55 60
 Ile His Arg Thr Gln His Trp Phe His Gly Arg Ile Ser Arg Glu Glu
 65 70 75 80
 Ser His Arg Ile Ile Lys Gln Gln Gly Leu Val Asp Gly Leu Phe Leu
 85 90 95
 Leu Arg Asp Ser Gln Ser Asn Pro Lys Ala Phe Val Leu Thr Leu Cys
 100 105 110

His His Gln Lys Ile Lys Asn Phe Gln Ile Leu Pro Cys Glu Asp Asp
 115 120 125
 Gly Gln Thr Phe Phe Thr Leu Asp Asp Gly Asn Thr Lys Phe Ser Asp
 130 135 140
 Leu Ile Gln Leu Val Asp Phe Tyr Gln Leu Asn Lys Gly Val Leu Pro
 145 150 155 160
 Cys Lys Leu Lys His His Cys Ile Arg Val Ala Leu
 165 170

<210> 12
 <211> 184
 <212> FRT
 <213> mus muris

<400> 12
 Pro Gln Arg Lys Gly Leu Pro Pro Pro Phe Asn Ala Pro Met Arg Ser
 1 5 10 15
 Val Ser Glu Asn Ser Leu Val Ala Met Asp Phe Ser Gly Gln Ile Gly
 20 25 30
 Arg Val Ile Asp Asn Pro Ala Glu Ala Gln Ser Ala Ala Leu Glu Glu
 35 40 45
 Gly His Ala Trp Arg Asn Gly Ser Thr Arg Met Asn Ile Leu Ser Ser
 50 55 60
 Gln Ser Pro Leu His Pro Ser Thr Leu Asn Ala Val Ile His Arg Thr
 65 70 75 80
 Gln His Trp Phe His Gly Arg Ile Ser Arg Glu Glu Ser His Arg Ile
 85 90 95
 Ile Lys Gln Gln Gly Leu Val Asp Gly Leu Phe Leu Leu Arg Asp Ser
 100 105 110
 Gln Ser Asn Pro Lys Ala Phe Val Leu Thr Leu Cys His His Gln Lys
 115 120 125
 Ile Lys Asn Phe Gln Ile Leu Pro Cys Glu Asp Asp Gly Gln Thr Phe
 130 135 140
 Phe Thr Leu Asp Asp Gly Asn Thr Lys Phe Ser Asp Leu Ile Gln Leu
 145 150 155 160
 Val Asp Phe Tyr Gln Leu Asn Lys Gly Val Leu Pro Cys Lys Leu Lys
 165 170 175
 His His Cys Ile Arg Val Ala Leu
 180

<210> 13
 <211> 43
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 13
 Pro Val Arg Ser Val Ser Glu Asn Ser Leu Val Ala Met Asp Phe Ser
 1 5 10 15
 Gly Gln Thr Gly Arg Val Ile Glu Asn Pro Ala Glu Ala Gln Ser Ala
 20 25 30
 Ala Leu Glu Glu Gly His Ala Trp Arg Lys Arg
 35 40

<210> 14
 <211> 82
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 14
 Gln Gln Arg Lys Ala Leu Leu Ser Pro Phe Ser Thr Pro Val Arg Ser
 1 5 10 15
 Val Ser Glu Asn Ser Leu Val Ala Met Asp Phe Ser Gly Gln Thr Gly
 20 25 30
 Arg Val Ile Glu Asn Pro Ala Glu Ala Gln Ser Ala Ala Leu Glu Glu
 35 40 45
 Gly His Ala Trp Arg Lys Arg Ser Thr Arg Met Asn Ile Leu Gly Ser
 50 55 60
 Gln Ser Pro Leu His Pro Ser Thr Leu Ser Thr Val Ile His Arg Thr
 65 70 75 80
 Gln His

<210> 15
 <211> 172
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 15
 Pro Val Arg Ser Val Ser Glu Asn Ser Leu Val Ala Met Asp Phe Ser
 1 5 10 15
 Gly Gln Thr Gly Arg Val Ile Glu Asn Pro Ala Glu Ala Gln Ser Ala
 20 25 30
 Ala Leu Glu Glu Gly His Ala Trp Arg Lys Arg Ser Thr Arg Met Asn
 35 40 45

Ile Leu Gly Ser Gln Ser Pro Leu His Pro Ser Thr Leu Ser Thr Val
 50 55 60
 Ile His Arg Thr Gln His Trp Phe His Gly Arg Phe Ser Arg Glu Glu
 65 70 75 80
 Ser His Arg Ile Ile Lys Gln Gln Gly Leu Val Asp Gly Leu Phe Leu
 85 90 95
 Leu Arg Asp Ser Gln Ser Asn Pro Lys Ala Phe Val Leu Thr Leu Cys
 100 105 110
 His His Gln Lys Ile Lys Asn Phe Gln Ile Leu Pro Cys Glu Asp Asp
 115 120 125
 Gly Gln Thr Phe Phe Ser Leu Asp Asp Gly Asn Thr Lys Phe Ser Asp
 130 135 140
 Leu Ile Gln Leu Val Asp Phe Tyr Gln Leu Asn Lys Gly Val Leu Pro
 145 150 155 160
 Cys Lys Leu Lys His His Cys Ile Arg Val Ala Leu
 165 170

<210> 16
 <211> 184
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 16
 Gln Gln Arg Lys Ala Leu Leu Ser Pro Phe Ser Thr Pro Val Arg Ser
 1 5 10 15
 Val Ser Glu Asn Ser Leu Val Ala Met Asp Phe Ser Gly Gln Thr Gly
 20 25 30
 Arg Val Ile Glu Asn Pro Ala Glu Ala Gln Ser Ala Ala Leu Glu Glu
 35 40 45
 Gly His Ala Trp Arg Lys Arg Ser Thr Arg Met Asn Ile Leu Gly Ser
 50 55 60
 Gln Ser Pro Leu His Pro Ser Thr Leu Ser Thr Val Ile His Arg Thr
 65 70 75 80
 Gln His Trp Phe His Gly Arg Phe Ser Arg Glu Glu Ser His Arg Ile
 85 90 95
 Ile Lys Gln Gln Gly Leu Val Asp Gly Leu Phe Leu Leu Arg Asp Ser
 100 105 110
 Gln Ser Asn Pro Lys Ala Phe Val Leu Thr Leu Cys His His Gln Lys
 115 120 125
 Ile Lys Asn Phe Gln Ile Leu Pro Cys Glu Asp Asp Gly Gln Thr Phe

10

130 135 140
 Phe Ser Leu Asp Asp Gly Asn Thr Lys Phe Ser Asp Leu Ile Gln Leu
 145 150 155 160
 Val Asp Phe Tyr Gln Leu Asn Lys Gly Val Leu Pro Cys Lys Leu Lys
 165 170 175
 His His Cys Ile Arg Val Ala Leu
 180

<210> 17
 <211> 43
 <212> PRT
 <213> Rattus sp.

<400> 17
 Pro Leu Arg Ser Val Ser Asp Asn Thr Leu Val Ala Met Asp Phe Ser
 1 5 10 15
 Gly His Ala Gly Arg Val Ile Asp Asn Pro Arg Glu Ala Leu Ser Ala
 20 25 30
 Ala Met Glu Glu Ala Gln Ala Trp Arg Lys Lys
 35 40

<210> 18
 <211> 80
 <212> PRT
 <213> Rattus sp.

<400> 18
 Ser Arg His Leu Arg Leu Ser Tyr Leu Gly Ser Pro Pro Leu Arg Ser
 1 5 10 15
 Val Ser Asp Asn Thr Leu Val Ala Met Asp Phe Ser Gly His Ala Gly
 20 25 30
 Arg Val Ile Asp Asn Pro Arg Glu Ala Leu Ser Ala Ala Met Glu Glu
 35 40 45
 Ala Gln Ala Trp Arg Lys Lys Thr Asn His Arg Leu Ser Leu Pro Thr
 50 55 60
 Thr Cys Ser Gly Ser Ser Leu Ser Ala Ala Ile His Arg Thr Gln Pro
 65 70 75 80

<210> 19
 <211> 170

<212> PRT

<213> Rattus sp.

<400> 19

Pro Leu Arg Ser Val Ser Asp Asn Thr Leu Val Ala Met Asp Phe Ser
 1 5 10 15

Gly His Ala Gly Arg Val Ile Asp Asn Pro Arg Glu Ala Leu Ser Ala
 20 25 30

Ala Met Glu Glu Ala Gln Ala Trp Arg Lys Lys Thr Asn His Arg Leu
 35 40 45

Ser Leu Pro Thr Thr Cys Ser Gly Ser Ser Leu Ser Ala Ala Ile His
 50 55 60

Arg Thr Gln Pro Trp Phe His Gly Arg Ile Ser Arg Glu Glu Ser Gln
 65 70 75 80

Arg Leu Ile Gly Gln Gln Gly Leu Val Asp Gly Val Phe Leu Val Arg
 85 90 95

Glu Ser Gln Arg Asn Pro Gln Gly Phe Val Leu Ser Leu Cys His Leu
 100 105 110

Gln Lys Val Lys His Tyr Leu Ile Leu Pro Ser Glu Asp Glu Gly Cys
 115 120 125

Leu Tyr Phe Ser Met Asp Glu Gly Gln Thr Arg Phe Thr Asp Leu Leu
 130 135 140

Gln Leu Val Glu Phe His Gln Leu Asn Arg Gly Ile Leu Pro Cys Leu
 145 150 155 160

Leu Arg His Cys Cys Ala Arg Val Ala Leu
 165 170

<210> 20

<211> 182

<212> PRT

<213> Rattus sp.

<400> 20

Ser Arg His Leu Arg Leu Ser Tyr Leu Gly Ser Pro Pro Leu Arg Ser
 1 5 10 15

Val Ser Asp Asn Thr Leu Val Ala Met Asp Phe Ser Gly His Ala Gly
 20 25 30

Arg Val Ile Asp Asn Pro Arg Glu Ala Leu Ser Ala Ala Met Glu Glu
 35 40 45

Ala Gln Ala Trp Arg Lys Lys Thr Asn His Arg Leu Ser Leu Pro Thr
 50 55 60

Thr Cys Ser Gly Ser Ser Leu Ser Ala Ala Ile His Arg Thr Gln Pro

[illegible]

<400> 21
Pro Leu Arg Ser Ala Ser Asp Asn Thr Leu Val Ala Met Asp Phe Ser
1 5 10 15
Gly His Ala Gly Arg Val Ile Glu Asn Pro Arg Glu Ala Leu Ser Val
20 25 30
Ala Leu Glu Glu Ala Gln Ala Trp Arg Lys Lys
35 40

```

<400> 22
Ser Arg His Leu His Pro Ser Cys Leu Gly Ser Pro Pro Leu Arg Ser
 1          5          10          15
Ala Ser Asp Asn Thr Leu Val Ala Met Asp Phe Ser Gly His Ala Gly
          20          25          30
Arg Val Ile Glu Asn Pro Arg Glu Ala Leu Ser Val Ala Leu Glu Glu
          35          40          45
Ala Gln Ala Trp Arg Lys Lys Thr Asn His Arg Leu Ser Leu Pro Met

```

13

50 55 60
 Pro Ala Ser Gly Thr Ser Leu Ser Ala Ala Ile His Arg Thr Gln Leu
 65 70 75 80

<210> 23
 <211> 170
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 23
 Pro Leu Arg Ser Ala Ser Asp Asn Thr Leu Val Ala Met Asp Phe Ser
 1 5 10 15
 Gly His Ala Gly Arg Val Ile Glu Asn Pro Arg Glu Ala Leu Ser Val
 20 25 30
 Ala Leu Glu Glu Ala Gln Ala Trp Arg Lys Lys Thr Asn His Arg Leu
 35 40 45
 Ser Leu Pro Met Pro Ala Ser Gly Thr Ser Leu Ser Ala Ala Ile His
 50 55 60
 Arg Thr Gln Leu Trp Phe His Gly Arg Ile Ser Arg Glu Glu Ser Gln
 65 70 75 80
 Arg Leu Ile Gly Gln Gln Gly Leu Val Asp Gly Leu Phe Leu Val Arg
 85 90 95
 Glu Ser Gln Arg Asn Pro Gln Gly Phe Val Leu Ser Leu Cys His Leu
 100 105 110
 Gln Lys Val Lys His Tyr Leu Ile Leu Pro Ser Glu Glu Glu Gly Arg
 115 120 125
 Leu Tyr Phe Ser Met Asp Asp Gly Gln Thr Arg Phe Thr Asp Leu Leu
 130 135 140
 Gln Leu Val Glu Phe His Gln Leu Asn Arg Gly Ile Leu Pro Cys Leu
 145 150 155 160
 Leu Arg His Cys Cys Thr Arg Val Ala Leu
 165 170

<210> 24
 <211> 182
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 24
 Ser Arg His Leu His Pro Ser Cys Leu Gly Ser Pro Pro Leu Arg Ser

14

1	5	10	15
Ala Ser Asp Asn Thr Leu Val Ala Met Asp Phe Ser Gly His Ala Gly	20	25	30
Arg Val Ile Glu Asn Pro Arg Glu Ala Leu Ser Val Ala Leu Glu Glu	35	40	45
Ala Gln Ala Trp Arg Lys Lys Thr Asn His Arg Leu Ser Leu Pro Met	50	55	60
Pro Ala Ser Gly Thr Ser Leu Ser Ala Ala Ile His Arg Thr Gln Leu	65	70	75
Trp Phe His Gly Arg Ile Ser Arg Glu Glu Ser Gln Arg Leu Ile Gly	85	90	95
Gln Gln Gly Leu Val Asp Gly Leu Phe Leu Val Arg Glu Ser Gln Arg	100	105	110
Asn Pro Gln Gly Phe Val Leu Ser Leu Cys His Leu Gln Lys Val Lys	115	120	125
His Tyr Leu Ile Leu Pro Ser Glu Glu Glu Gly Arg Leu Tyr Phe Ser	130	135	140
Met Asp Asp Gly Gln Thr Arg Phe Thr Asp Leu Leu Gln Leu Val Glu	145	150	155
Phe His Gln Leu Asn Arg Gly Ile Leu Pro Cys Leu Leu Arg His Cys	165	170	175
Cys Thr Arg Val Ala Leu	180		

<210> 25
 <211> 43
 <212> PRT
 <213> mus muris

<400> 25
 Pro Leu Arg Ser Val Ser Asp Asn Thr Leu Val Ala Met Asp Phe Ser
 1 5 10 15
 Gly His Ala Gly Arg Val Ile Asp Asn Pro Arg Glu Ala Leu Ser Ala
 20 25 30
 Ala Met Glu Glu Ala Gln Ala Trp Arg Lys Lys
 35 40

<210> 26
 <211> 80
 <212> PRT
 <213> mus muris

15

<400> 26

Ser Arg His Leu Arg Leu Ser Tyr Leu Gly Ser Pro Pro Leu Arg Ser
 1 5 10 15
 Val Ser Asp Asn Thr Leu Val Ala Met Asp Phe Ser Gly His Ala Gly
 20 25 30
 Arg Val Ile Asp Asn Pro Arg Glu Ala Leu Ser Ala Ala Met Glu Glu
 35 40 45
 Ala Gln Ala Trp Arg Lys Lys Thr Asn His Arg Leu Ser Leu Pro Thr
 50 55 60
 Thr Cys Ser Gly Ser Ser Leu Ser Ala Ala Ile His Arg Thr Gln Pro
 65 70 75 80

<210> 27

<211> 170

<212> PRT

<213> mus muris

<400> 27

Pro Leu Arg Ser Val Ser Asp Asn Thr Leu Val Ala Met Asp Phe Ser
 1 5 10 15
 Gly His Ala Gly Arg Val Ile Asp Asn Pro Arg Glu Ala Leu Ser Ala
 20 25 30
 Ala Met Glu Glu Ala Gln Ala Trp Arg Lys Lys Thr Asn His Arg Leu
 35 40 45
 Ser Leu Pro Thr Thr Cys Ser Gly Ser Ser Leu Ser Ala Ala Ile His
 50 55 60
 Arg Thr Gln Pro Trp Phe His Gly Arg Ile Ser Arg Glu Glu Ser Gln
 65 70 75 80
 Arg Leu Ile Gly Gln Gln Gly Leu Val Asp Gly Val Phe Leu Val Arg
 85 90 95
 Glu Ser Gln Arg Asn Pro Gln Gly Phe Val Leu Ser Leu Cys His Leu
 100 105 110
 Gln Lys Val Lys His Tyr Leu Ile Leu Pro Ser Glu Asp Glu Gly Cys
 115 120 125
 Leu Tyr Phe Ser Met Asp Glu Gly Gln Thr Arg Phe Thr Asp Leu Leu
 130 135 140
 Gln Leu Val Glu Phe His Gln Leu Asn Arg Gly Ile Leu Pro Cys Leu
 145 150 155 160

16

Leu Arg His Cys Cys Ala Arg Val Ala Leu
165 170

<210> 28
<211> 182
<212> PRT
<213> mus muris

<400> 28
Ser Arg His Leu Arg Leu Ser Tyr Leu Gly Ser Pro Pro Leu Arg Ser
1 5 10 15
Val Ser Asp Asn Thr Leu Val Ala Met Asp Phe Ser Gly His Ala Gly
20 25 30
Arg Val Ile Asp Asn Pro Arg Glu Ala Leu Ser Ala Ala Met Glu Glu
35 40 45
Ala Gln Ala Trp Arg Lys Lys Thr Asn His Arg Leu Ser Leu Pro Thr
50 55 60
Thr Cys Ser Gly Ser Ser Leu Ser Ala Ala Ile His Arg Thr Gln Pro
65 70 75 80
Trp Phe His Gly Arg Ile Ser Arg Glu Glu Ser Gln Arg Leu Ile Gly
85 90 95
Gln Gln Gly Leu Val Asp Gly Val Phe Leu Val Arg Glu Ser Gln Arg
100 105 110
Asn Pro Gln Gly Phe Val Leu Ser Leu Cys His Leu Gln Lys Val Lys
115 120 125
His Tyr Leu Ile Leu Pro Ser Glu Asp Glu Gly Cys Leu Tyr Phe Ser
130 135 140
Met Asp Glu Gly Gln Thr Arg Phe Thr Asp Leu Leu Gln Leu Val Glu
145 150 155 160
Phe His Gln Leu Asn Arg Gly Ile Leu Pro Cys Leu Leu Arg His Cys
165 170 175
Cys Ala Arg Val Ala Leu
180

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/FR 00/00613

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 G01N33/74 G01N33/56 G01N33/573

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)
EPO-Internal, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 5 840 536 A (DUNNINGTON DAMIEN J ET AL) 24 November 1998 (1998-11-24) column 3, line 9 - line 54 ---	1-7
Y	US 5 726 027 A (OLEFSKY JERROLD M) 10 March 1998 (1998-03-10) abstract ---	1-7
Y	WO 98 01475 A (DUNNINGTON DAMIEN J ; SHOELSON STEVEN E (US); SMITHKLINE BEECHAM CO) 15 January 1998 (1998-01-15) claims 17-20 --- -/--	1-7

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

5 July 2000

Date of mailing of the international search report

12/07/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Hart-Davis, J

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR 00/00613

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	A KASUS-JACOBI, D PERDEREAU, C AUZAN, E CLAUSER, E VAN OBBERGHEM, F MAUVAIS-JARVIS, J GIRARD, A-F BURNOL: "Identification of the Rat Adapter Grb14 as an Inhibitor of Insulin Actions" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 273, no. 40, 2 October 1998 (1998-10-02), pages 26026-26035, XP002124253 cited in the application the whole document ---	1-7
Y	T J O'NEILL, D W ROSE, T S PILLAY, K HOTTA, J M OLEFSKY, T A GUSTAFSON: "Interaction of a GRB-IR Splice Variant (a Human GRB10 Homolog) with the Insulin and Insulin-like Growth Factor I Receptors" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 271, no. 37, 13 September 1996 (1996-09-13), pages 22506-22513, XP002124254 cited in the application the whole document ---	1-7
Y	R J DALY, G M SANDERSON, P W JANES, R L SUTHERLAND: "Cloning and Characterization of GRB14, a Novel Member of the GRB7 Gene Family" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 271, no. 21, 24 May 1996 (1996-05-24), pages 12502-12510, XP002124255 cited in the application the whole document ---	1-7
Y	W HE, D W ROSE, J M OLEFSKY, T A GUSTAFSON: "Grb10 Interacts Differentially with the Insulin Receptor, Insulin-like Growth Factor I Receptor, and Epidermal Growth Factor Receptor via the Grb10 Src Homology (SH2) Domain and a Second Novel Domain Located between the Pleckstrin Homology and SH2 Domains" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 273, no. 12, 20 March 1998 (1998-03-20), pages 6860-6867, XP002124256 cited in the application the whole document --- -/--	1-7

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/FR 00/00613

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	J D FRANTZ, S GIORGETTI-PERALDI, E A OTTINGER, S E SHOELSON: "Human GRB-IRbeta/GRB10" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 272, no. 5, 31 January 1997 (1997-01-31), pages 2659-2667, XP002124257 cited in the application the whole document	1-7
P,X	US 5 889 150 A (MARGOLIS BENJAMIN L ET AL) 30 March 1999 (1999-03-30) column 51 -column 53; example 10	1-7
A	F LIU, R A ROTH: "Grb-IR: A SH2-domain-containing protein that binds to the insulin receptor and inhibits its function" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, vol. 92, October 1995 (1995-10), pages 10287-10291, XP002124258 cited in the application the whole document	1-7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/FR 00/00613

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5840536 A	24-11-1998	NONE	
US 5726027 A	10-03-1998	AU 1967897 A WO 9732595 A	22-09-1997 12-09-1997
WO 9801475 A	15-01-1998	AU 6450696 A	02-02-1998
US 5889150 A	30-03-1999	US 5434064 A US 5618691 A US 5677421 A US 5858686 A AT 187772 T AU 667803 B AU 1234692 A CA 2100860 A DE 69230433 D EP 0567567 A JP 6505561 T MX 9200246 A PT 100037 A, B WO 9213001 A	18-07-1995 08-04-1997 14-10-1997 12-01-1999 15-01-2000 18-04-1996 27-08-1992 19-07-1992 20-01-2000 03-11-1993 23-06-1994 31-03-1994 31-03-1993 06-08-1992

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Den e internationale No
PCT/FR 00/00613

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE CIB 7 G01N33/74 G01N33/566 G01N33/573		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) CIB 7 G01N		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés) EPO-Internal, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	US 5 840 536 A (DUNNINGTON DAMIEN J ET AL) 24 novembre 1998 (1998-11-24) colonne 3, ligne 9 - ligne 54	1-7
Y	US 5 726 027 A (OLEFSKY JERROLD M) 10 mars 1998 (1998-03-10) abrégé	1-7
Y	WO 98 01475 A (DUNNINGTON DAMIEN J ; SHOELSON STEVEN E (US); SMITHKLINE BEECHAM CO) 15 janvier 1998 (1998-01-15) revendications 17-20	1-7
	-/--	
<input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents <input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe		
* Catégories spéciales de documents cités: "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée) "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier "&" document qui fait partie de la même famille de brevets		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée 5 juillet 2000		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale 12/07/2000
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tél. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 851 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3018		Fonctionnaire autorisé Hart-Davis, J

Formulaire PCT/ISA210 (deuxième feuille) (juillet 1992)

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dem. internationale No
PCT/FR 00/00613

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	A KASUS-JACOBI, D PERDEREAU, C AUZAN, E CLAUSER, E VAN OBBERGHEN, F MAUVAIS-JARVIS, J GIRARD, A-F BURNOL: "Identification of the Rat Adapter Grb14 as an Inhibitor of Insulin Actions" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 273, no. 40, 2 octobre 1998 (1998-10-02), pages 26026-26035, XP002124253 cité dans la demande le document en entier ---	1-7
Y	T J O'NEILL, D W ROSE, T S PILLAY, K HOTTA, J M OLEFSKY, T A GUSTAFSON: "Interaction of a GRB-IR Splice Variant (a Human GRB10 Homolog) with the Insulin and Insulin-like Growth Factor I Receptors" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 271, no. 37, 13 septembre 1996 (1996-09-13), pages 22506-22513, XP002124254 cité dans la demande le document en entier ---	1-7
Y	R J DALY, G M SANDERSON, P W JANES, R L SUTHERLAND: "Cloning and Characterization of GRB14, a Novel Member of the GRB7 Gene Family" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 271, no. 21, 24 mai 1996 (1996-05-24), pages 12502-12510, XP002124255 cité dans la demande le document en entier ---	1-7
Y	W HE, D W ROSE, J M OLEFSKY, T A GUSTAFSON: "Grb10 Interacts Differentially with the Insulin Receptor, Insulin-like Growth Factor I Receptor, and Epidermal Growth Factor Receptor via the Grb10 Src Homology (SH2) Domain and a Second Novel Domain Located between the Pleckstrin Homology and SH2 Domains" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 273, no. 12, 20 mars 1998 (1998-03-20), pages 6860-6867, XP002124256 cité dans la demande le document en entier ---	1-7

-/--

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Don: Internationale No
PCT/FR 00/00613

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	J D FRANTZ, S GIORGETTI-PERALDI, E A OTTINGER, S E SHOELSON: "Human GRB-IRbeta/GRB10" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 272, no. 5, 31 janvier 1997 (1997-01-31), pages 2659-2667, XP002124257 cité dans la demande le document en entier ----	1-7
P,X	US 5 889 150 A (MARGOLIS BENJAMIN L ET AL) 30 mars 1999 (1999-03-30) colonne 51 -colonne 53; exemple 10 ----	1-7
A	F LIU, R A ROTH: "Grb-IR: A SH2-domain-containing protein that binds to the insulin receptor and inhibits its function" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, vol. 92, octobre 1995 (1995-10), pages 10287-10291, XP002124258 cité dans la demande le document en entier -----	1-7

1

Formulaire PCT/ISA/210 (suite de la deuxième feuille) (juillet 1992)

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demanda internationale No
PCT/FR 00/00613

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
US 5840536 A	24-11-1998	AUCUN	
US 5726027 A	10-03-1998	AU 1967897 A WO 9732595 A	22-09-1997 12-09-1997
WO 9801475 A	15-01-1998	AU 6450696 A	02-02-1998
US 5889150 A	30-03-1999	US 5434064 A US 5618691 A US 5677421 A US 5858686 A AT 187772 T AU 667803 B AU 1234692 A CA 2100860 A DE 69230433 D EP 0567567 A JP 6505561 T MX 9200246 A PT 100037 A,B WO 9213001 A	18-07-1995 08-04-1997 14-10-1997 12-01-1999 15-01-2000 18-04-1996 27-08-1992 19-07-1992 20-01-2000 03-11-1993 23-06-1994 31-03-1994 31-03-1993 06-08-1992

GRB14 ET LE RECEPTEUR DE L'INSULINE AINSI QUE CRIBLAGE DE NOUVEAUX MEDICAMENTS

5 La présente invention se rapporte à l'utilisation de la protéine Grb14 et des protéines adaptatrices homologues (protéines de la famille Grb7), comme outil de criblage de molécules destinées au traitement des maladies impliquant l'insuline.

 L'insuline, hormone principale de la régulation du métabolisme énergétique est la seule hormone hypoglycémiante de l'organisme ; elle stimule le
10 transport du glucose et son utilisation par les tissus périphériques (muscles squelettiques et tissu adipeux) et inhibe la production endogène de glucose par le foie.

 L'insuline agit par l'intermédiaire d'un récepteur qui est exprimé à la membrane plasmique des cellules. Ce récepteur fait partie de la famille des récepteurs à activité tyrosine kinase, qui sont caractérisés par la présence d'un domaine
15 intracellulaire portant l'activité catalytique. La liaison du ligand induit la dimérisation des récepteurs, l'activation du domaine tyrosine kinase, et la phosphorylation (autophosphorylation et transphosphorylation) de résidus tyrosines spécifiques présents dans la partie cytosolique des récepteurs (Ullrich, A. et al. (1990) *Cell*, 61, 203-212).

20 Le récepteur de l'insuline possède la particularité d'être présent sous une forme naturellement dimérisée. La liaison de l'insuline à la sous-unité α extracellulaire induit des modifications conformationnelles qui aboutissent à l'activation du domaine kinase porté par la sous-unité β du récepteur, et à son autophosphorylation, nécessaire à l'activation complète du récepteur. Le récepteur de
25 l'insuline ainsi activé phosphoryle des protéines intracellulaires qui servent d'effecteurs du signal de l'insuline.

 En effet, la transduction d'un signal à l'intérieur de la cellule après la stimulation d'un récepteur à activité tyrosine kinase, fait appel à des cascades d'interactions protéine-protéine, qui aboutissent à un effet métabolique ou
30 mitogénique, et dans lesquelles les adaptateurs moléculaires ont un rôle privilégié. Par l'intermédiaire de leurs domaines d'interactions protéiques, les adaptateurs permettent le recrutement des effecteurs successifs, constituant les voies de signalisation.

 Parmi les différents relais entre le récepteur de l'insuline et ses

est très bien corrélée avec la sensibilité des tissus à l'insuline et que sa surexpression dans des cellules CHO-IR (*Chinese Hamster Ovary* exprimant des taux élevés de récepteurs de l'insuline d'origine humaine) inhibe les effets de l'insuline en diminuant l'activation de IRS-1 sans modifier l'autophosphorylation du récepteur de l'insuline.

5 (Kasus-Jacobi et al. (1998) déjà cité).

Les protéines adaptatrices de la famille de Grb7 sont caractérisées par la succession de trois domaines :

- une séquence riche en proline appelée PP, près de l'extrémité amino-terminale,

10 - un domaine central appelé PH (*Pleckstrin homology*) et

- un domaine appelé SH2 (*Src homology 2*) à l'extrémité carboxy-terminale, connu pour interagir avec les séquences contenant des phosphotyrosines (Ooi J. et al. (1995) *Oncogene*, **10**, 1621-1630 ; Margolis B. (1992) déjà cité ; Daly R.J. (1996) déjà cité).

15 Outre ces domaines qui ont été déjà bien étudiés dans d'autres protéines, les Inventeurs ont mis en évidence un nouveau domaine sur la protéine rGrb14, appelé PIR (*Phosphorylated Insulin Receptor Interacting Region*) correspondant aux résidus 340 à 437 de la protéine ; par comparaison entre les protéines Grb7, Grb10 et Grb14, les Inventeurs ont montré qu'une séquence de 43
20 acides aminés correspondant aux acides 365 à 407 de la protéine rGrb14 est hautement conservée dans l'ensemble de la famille de ces protéines (Kasus-Jacobi et al. (1998) déjà cité) et devrait jouer un rôle particulier dans la fixation de ces protéines sur le récepteur de l'insuline.

Le domaine PIR est homologue au domaine BPS (*Between PH and*
25 *SH2*), (Kasus-Jacobi et al. (1998) déjà cité), récemment mis en évidence sur la protéine hGrb10 (He W. et al. (1998) *J. Biol. Chem.*, **273**, 6860-6867) et correspond aux acides aminés 358-434 de la protéine Grb14.

L'association entre le récepteur de l'insuline activé et les protéines de la famille Grb7 fait intervenir les deux domaines PIR et SH2. En fonction de la protéine
30 Grb considérée, le rôle respectif des deux domaines est plus ou moins important. En effet, c'est essentiellement le PIR qui est responsable de la liaison de Grb14 sur le récepteur de l'insuline (Kasus-Jacobi et al. (1998) déjà cité), alors que le PIR et le SH2 sont impliqués dans l'interaction entre Grb10 et le récepteur (He et al (1998) déjà cité).

35 Plusieurs équipes ont montré qu'il y avait des défauts de

protéines rGrb14, hGrb14, mGrb10, hGrb10, rGrb7, hGrb7 et mGrb7).

Au sens de la présente invention la numérotation des résidus des fragments de protéines est donnée en référence à la séquence de la protéine rGrb14, après alignement.

5 De façon intéressante, les Inventeurs ont montré que l'effet inhibiteur de la protéine Grb14 est reproduit par les protéines de fusion GST-PIR et GST-PIR+SH2 purifiées, obtenues par fusion de la GST avec le domaine PIR ou le domaine PIR+SH2 de rGrb14. En revanche cet effet inhibiteur n'est pas observé avec la protéine de fusion GST-SH2 obtenue par fusion GST avec le domaine SH2 de rGrb14.

10 De façon inattendue, les Inventeurs ont montré que le domaine PIR seul a une activité équivalente à celle de la protéine entière alors que le domaine PIR+SH2 a un effet inhibiteur beaucoup plus important que le PIR exprimé seul. En effet l'inhibition totale de l'activité tyrosine kinase des récepteurs de l'insuline est obtenue lorsque l'on ajoute 0,3 µg de protéine GST-PIR, alors qu'il ne faut que 0,03
15 µg de GST-PIR+SH2. Il semble donc que si le domaine SH2 n'a pas d'activité inhibitrice propre, par contre il potentialise fortement l'effet du PIR.

De façon comparable, les Inventeurs ont montré que les domaines PIR et PIR+SH2 de Grb10 ont un effet inhibiteur sur l'activité tyrosine kinase du récepteur de l'insuline. Le domaine SH2 de Grb10 n'a pas en lui-même d'effet inhibiteur, mais
20 il potentialise également l'inhibition induite par le PIR.

De plus, les Inventeurs ont montré que le récepteur de l'insuline est plus sensible à l'effet inhibiteur de Grb14 qu'à celui de Grb10 et de Grb7, et que l'effet peut être obtenu aussi bien avec la protéine entière qu'avec le domaine PIR ou le domaine PIR-SH2.

25 Les domaines PIR et PIR-SH2 des protéines Grb14, Grb10 et Grb7 se comportent donc comme des inhibiteurs endogènes de l'activité tyrosine kinase du récepteur de l'insuline, ce qui est une fonction tout à fait nouvelle pour des adaptateurs moléculaires. En effet, contrairement aux protéines adaptatrices IRS-1, IRS-2 ou Shc qui sont des intermédiaires entre le récepteur de l'insuline et des effecteurs cellulaires,
30 lesdits domaines des protéines de la famille Grb7 agissent directement sur l'activité tyrosine kinase du récepteur de l'insuline.

En conséquence, les domaines PIR et PIR-SH2 de la protéine Grb14 et des protéines adaptatrices homologues (protéines de la famille Grb7) constituent des cibles potentielles pour des médicaments.

35 En effet, des composés qui sont susceptibles d'augmenter ou de

GST.

Ledit récepteur peut par exemple être marqué avec une molécule radioactive, ou fusionné à une protéine fluorescente telle que la GFP (*Green Fluorescent Protein*).

5 Lorsque ledit récepteur est marqué avec une molécule fluorescente ou radioactive, l'interaction entre ledit fragment et ledit récepteur est détectée par lecture de la fluorescence ou de la radioactivité retenue sur le support solide.

La présente invention a également pour objet l'utilisation d'une molécule apte à se lier à un fragment constitué par le domaine PIR ou le domaine PIR-
10 SH2 d'une protéine de la famille des protéines Grb7 et à inhiber l'activité tyrosine kinase du récepteur de l'insuline, pour la fabrication d'un médicament utile dans le traitement des maladies impliquant l'insuline, notamment le diabète et l'obésité.

Selon un mode de réalisation avantageux de ladite utilisation, ladite molécule est obtenue par le procédé conforme à l'invention.

15 Les composés ainsi sélectionnés sont potentiellement utiles pour prévenir ou traiter des maladies impliquant l'insuline comme par exemple le diabète et l'obésité ou d'autres pathologies caractérisées par une résistance à l'insuline telles que l'ovaire polycystique (Legro, R. S. et al. (1998), *Rec. Progr. Hormone Res.*, **53**, 217-255) ou le syndrome X (Komers, R. et al. (1998), *Physiol. Res.*, **47**, 215-225).

20 Outre les dispositions qui précèdent, l'invention comprend encore d'autres dispositions, qui ressortiront de la description qui va suivre, qui se réfère à des exemples de mise en œuvre du procédé objet de la présente invention ainsi qu'aux dessins annexés, dans lesquels :

- la figure 1 illustre l'alignement des protéines de la famille des
25 protéines Grbs. Les pourcentages d'identité en acides aminés des domaines sont exprimés par rapport au domaine homologue de rGrb14. PP : motif riche en résidus proline, site de liaison de protéines contenant des domaines SH3 ; PH : domaine d'homologie avec la plexstrine, association avec des phospholipides ou des protéines ; PIR, *phosphorylated insulin receptor interacting region* ; SH2, domaine permettant
30 une interaction avec des résidus phosphotyrosines.

- la figure 2 illustre l'alignement des séquences des domaines PIR des
protéines de la famille des protéines Grb : rGrb14, hGrb14, hGrb10 et hGrb7. La numérotation des acides aminés est donnée en référence à la séquence de la protéine rGrb14. Les acides aminés conservés sont indiqués par un astérisque. Le domaine
35 conservé correspondant aux résidus 365-407 des protéines Grb est grisé.

statistiquement significatives, indiquées par: * pour $p < 0,05$, ** pour $p < 0,01$ et *** pour $p < 0,001$.

Exemple 1 : Comparaison de l'effet des protéines rGrb14, mGrb10 et rGrb7 sur l'activité tyrosine kinase des récepteurs de l'insuline

5 1. Mode opératoire:

Des récepteurs de l'insuline sont partiellement purifiés à partir de cellules CHO-IR, en passant un lysat cellulaire sur une colonne de lectine de germe de blé et en éluant les glycoprotéines retenues avec de la N-acétylglucosamine 0,3M. Les récepteurs de l'insuline ainsi purifiés sont incubés en présence d'insuline (0 ou 10^{-7} M) pendant 1 heure à température ambiante. On ajoute alors un tampon contenant de l'ATP 20 μ M, des ions $MnCl_2$ et $MgCl_2$ et du $[\gamma\text{-}^{32}P]$ ATP pour permettre aux récepteurs de s'autophosphoryler, et des quantités croissantes des protéines Grbs purifiées exprimées en fusion avec la GST. 30 minutes après, on ajoute 15 μ g d'un substrat de synthèse, le poly Glu-Tyr (4:1). L'activité tyrosine kinase des récepteurs est mesurée par l'incorporation de radioactivité dans le poly Glu-Tyr pendant 30 min.

2. Résultats:

Ils sont représentés à la figure 4.

L'addition des protéines de fusion GST-rGrb14 et GST-mGrb10 induit une inhibition dose-dépendante de l'activité tyrosine kinase des récepteurs de l'insuline, et les concentrations les plus élevées permettent une inhibition totale de l'enzyme. Par comparaison, la protéine GST-rGrb7 ne permet au maximum qu'une inhibition de 40%. La courbe dose-réponse de l'effet de GST-mGrb10 est déplacée sur la droite par rapport à la courbe de l'effet de GST-rGrb14. Une inhibition de 50% de l'activité tyrosine kinase des récepteurs est obtenue en utilisant respectivement 0,04 μ g de GST-rGrb14 et 0,13 μ g de GST-mGrb10. L'activité tyrosine kinase des récepteurs de l'insuline est donc plus sensible à l'effet inhibiteur de rGrb14 qu'à celui de mGrb10.

Ces résultats montrent que les protéines Grbs ont une activité inhibitrice sur l'activité tyrosine kinase des récepteurs de l'insuline, et que la protéine rGrb14 a l'effet inhibiteur le plus important.

Exemple 2 : Effet inhibiteur des différents domaines de rGrb14 sur l'activité tyrosine kinase des récepteurs de l'insuline

1. Mode opératoire:

Les récepteurs de l'insuline sont partiellement purifiés comme décrit dans l'exemple 1. Les différents domaines de rGrb14 (rGrb14, PIR, SH2, PIR+SH2,

Le domaine PIR exerce un effet inhibiteur comparable à celui exercé par la protéine entière. Le domaine SH2 seul n'a pas d'action inhibitrice, mais il potentialise l'inhibition exercée par le PIR (la courbe dose-réponse du PIR+SH2 est décalée vers la gauche). Les domaines PIR et PIR-SH2 de rGrb7 ont un effet inhibiteur moindre comparé à celui des domaines PIR et PIR-SH2 des protéines rGrb14 et mGrb10.

Ainsi que cela ressort de ce qui précède, l'invention ne se limite nullement à ceux de ses modes de mise en œuvre, de réalisation et d'application qui viennent d'être décrits de façon plus explicite ; elle en embrasse au contraire toutes les variantes qui peuvent venir à l'esprit du technicien en la matière, sans s'écarter du cadre, ni de la portée de la présente invention.

le domaine PIR ou le domaine PIR-SH2 d'une protéine de la famille des protéines Grb7 et à inhiber l'activité tyrosine kinase du récepteur de l'insuline, pour la fabrication d'un médicament utile dans le traitement des maladies impliquant l'insuline.

- 5 7. Utilisation selon la revendication 6, caractérisée en ce que ladite molécule est obtenue par le procédé selon l'une quelconque des revendications 3 à 5.

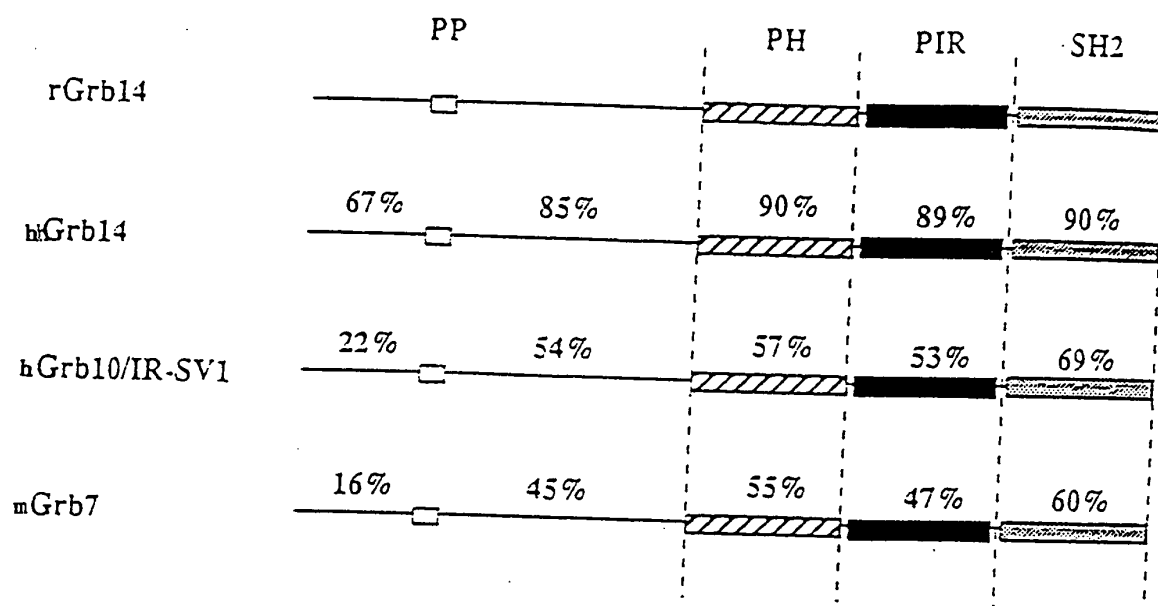


FIG. 1

rGrb14	365	QARSACSSQS-VSPHRSVSEHSLVANDPESGOKTRVIDHTEALSVAVEEGIAHKK	407	436
hGrb14	353	QGRSGCSSQS-ISPMSISESLVANDPESGOKSRVIRHFEALSVAVEEGIAHKK		
hGrb10/IR-SV1	353	QQRKALLSPF-STVHSVBENSIVANDPESGOTGRVTEHPEAQSAAMERGINHKK		
hGrb7	354	-SIIHLPSCIGSPFIRSA SDITLVANDPESGIIAGRVTEHPEALSVAVEEGIAHKK		
				---ASGTSLSAATHHTQL

FIG. 2

Domaines PIR-SH2:

rGrb14

Q A R S A C S S Q S V S P M R S V S E N S L V A M D F S G Q K T R V I D N P T E A L S V A V E E G L A W R K K G C
 L R L G N H G S P T A P S Q S S A V N M A L H R S Q P W F H H R I S R D E A Q Q L I T R Q G P V D G V F L V R D S
 Q S N P R T F V L S M S H G Q K I K H F Q I I P V E D D G E V F H T L D D G H T K F T D L I Q L V E F Y Q L N K G
 V L P C K L K H Y C A R M A V.

hGrb10

Q Q R K A L L S P F S T P V R S V S E N S L V A M D F S G Q T G R V I E N P A E A Q S A A L E E G H A W R K R S T
 R M N I L G S Q S P L H P S T L S T V I H R T Q H W F H G R F S R E E S H R I I K Q Q G L V D G L F L L R D S Q S
 N P K A F V L T L C H H Q K I K N F Q I L P C E D D G Q T F F S L D D G N T K F S D L I Q L V D F Y Q L N K G V L
 P C K L K H H C I R V A L

hGrb7

S R H L H P S C L G S P P L R S A S D N T L V A M D F S G H A G R V I E N P R E A L S V A L E E A Q A W R K K T N
 H R L S L P M P A S G T S L S A I H R T Q L W F H G R I S R E E S Q R L I G Q Q G L V D G L F L V R E S Q R N P
 Q G F V L S L C H L Q K V K H Y L I L P S E E E G R L Y F S M D D G Q T R F T D L L Q L V E F H Q L N R G I C L L
 R H C C T R V A L

FIGURE 3

4/7

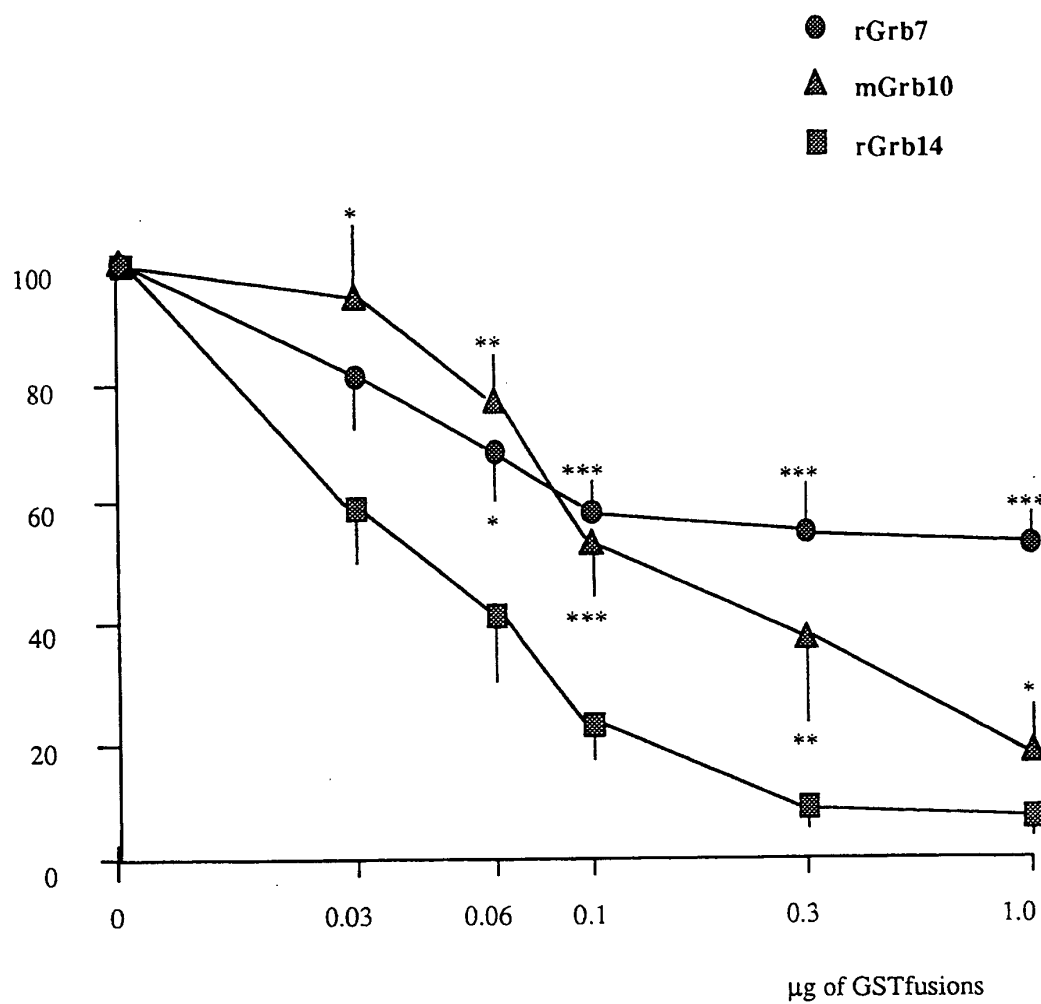


Figure 4

5/7

rGrb14

- ▲ PIR
- ⊗ SH2
- PIR-SH2
- ◊ PIR-SH2 R464K

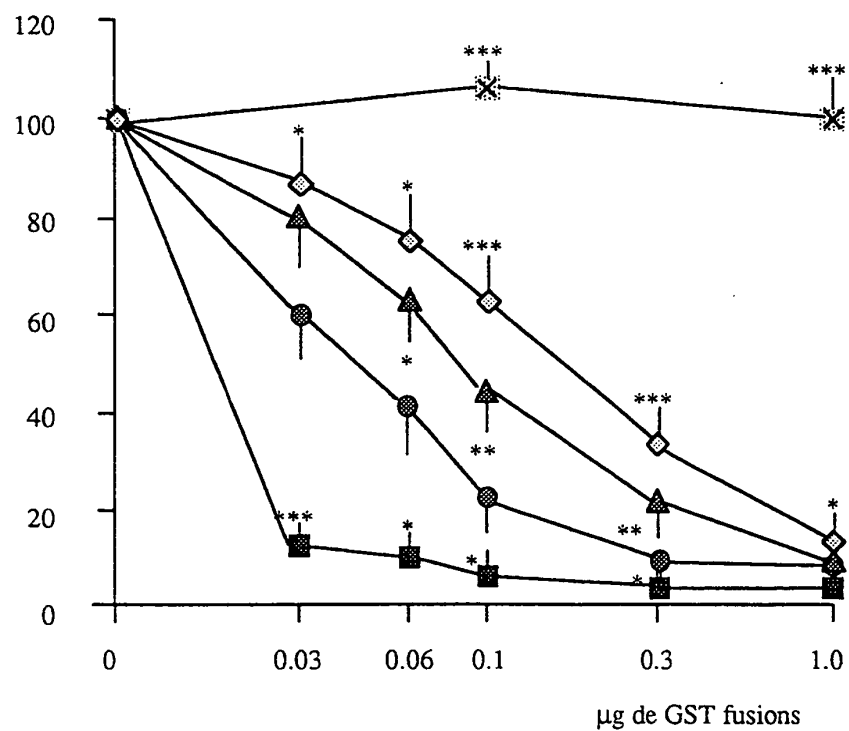


Figure 5

6/7

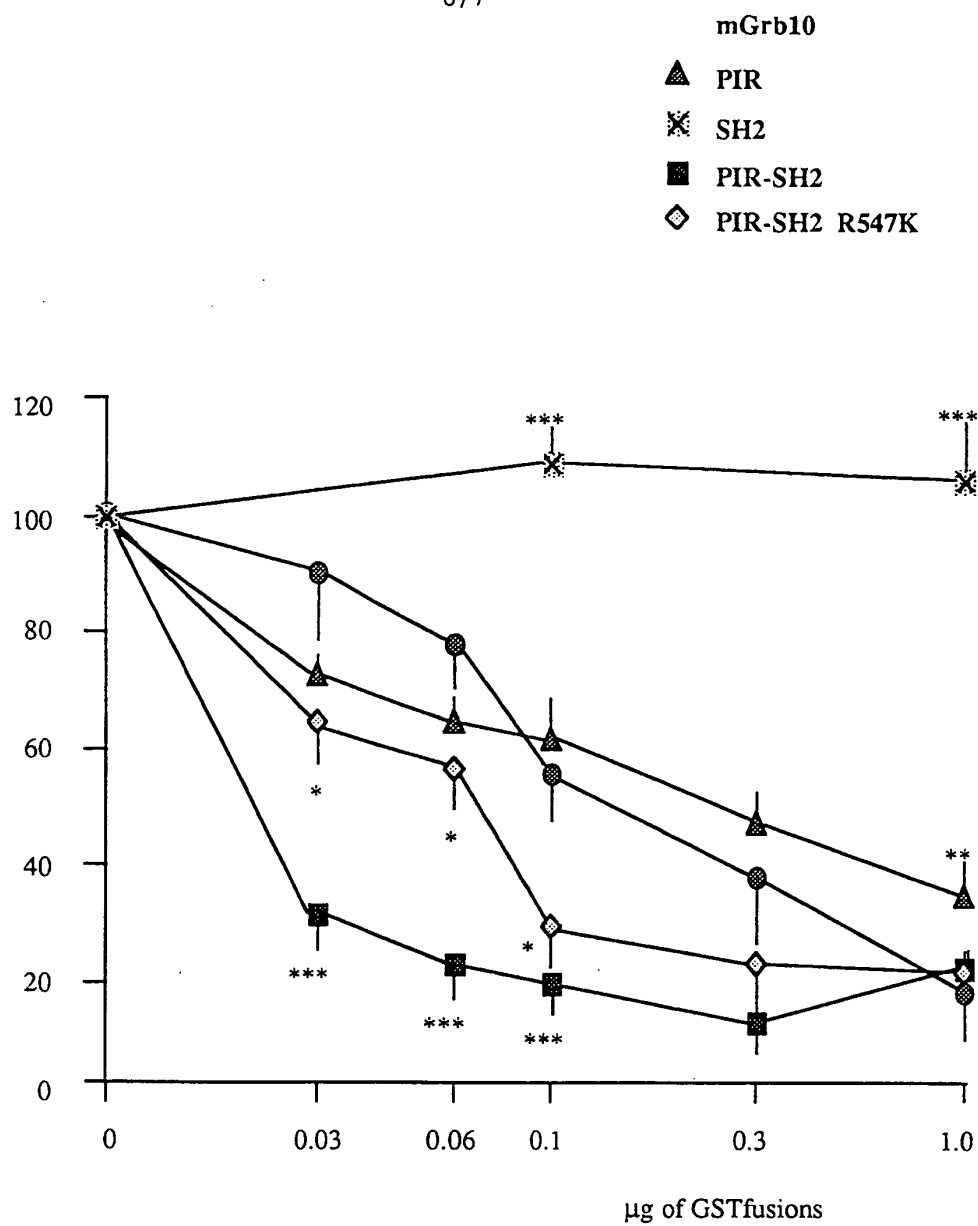


Figure 6

7/7

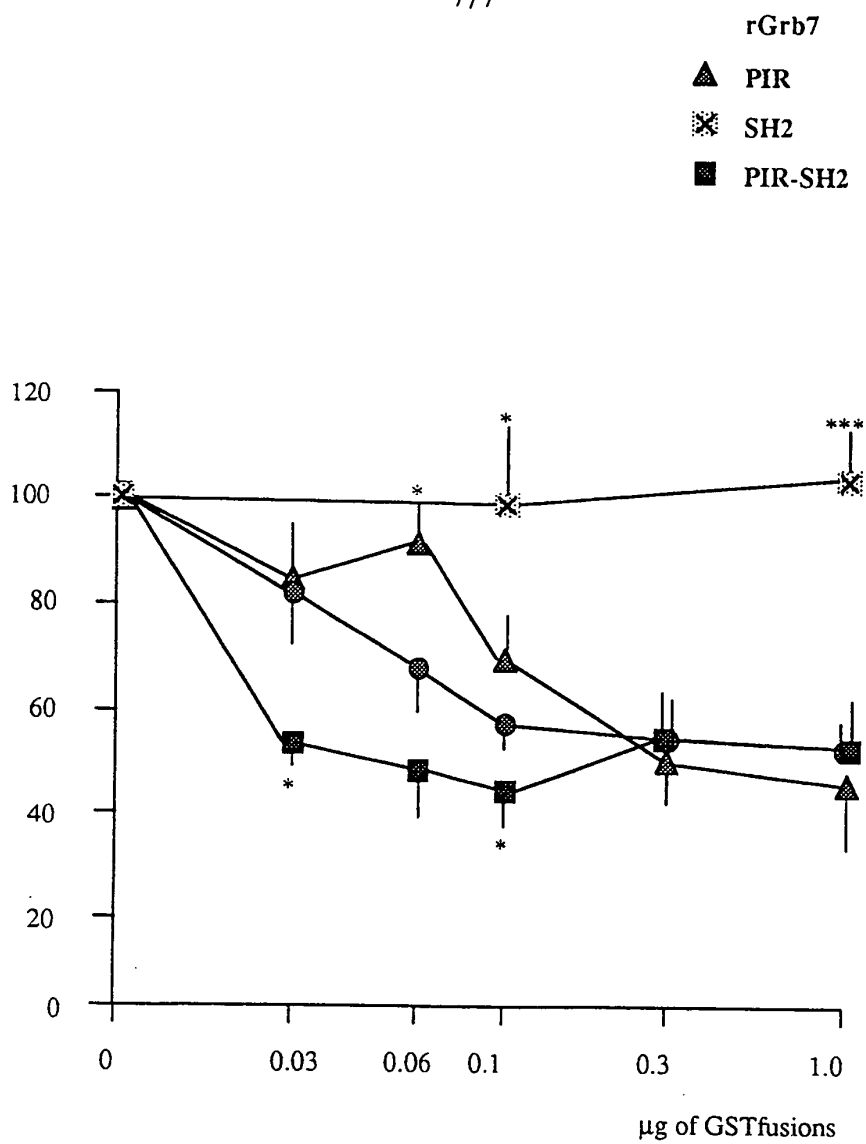


Figure 7

LISTE DE SEQUENCES

- <110> BURNOL, ANNE-FRANCOISE
 PERDEREAU, DOMINIQUE
 KASUS-JACOBI, ANNE
 BEREZIAT, VERONIQUE
 GIRARD, JEAN
 CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
- <120> UTILISATION DE LA PROTEINE Grb14 ET DES PROTEINES
 ADAPTATRICES HOMOLOGUES COMME OUTIL DE CRIBLAGE DE
 MOLECULES DESTINEES AU TRAITEMENT DES MALADIES IMPLIQUANT
 L'INSULINE
- <130> 64441EXT
- <140>
 <141>
- <160> 28
- <170> PatentIn Ver. 2.1
- <210> 1
 <211> 43
 <212> PRT
 <213> Rattus sp.
- <400> 1
 Pro Met Arg Ser Val Ser Glu Asn Ser Leu Val Ala Met Asp Phe Ser
 1 5 10 15
 Gly Gln Lys Thr Arg Val Ile Asp Asn Pro Thr Glu Ala Leu Ser Val
 20 25 30
 Ala Val Glu Glu Gly Leu Ala Trp Arg Lys Lys
 35 40
- <210> 2
 <211> 84
 <212> PRT
 <213> Rattus sp.
- <400> 2
 Gln Ala Arg Ser Ala Cys Ser Ser Gln Ser Val Ser Pro Met Arg Ser
 1 5 10 15
 Val Ser Glu Asn Ser Leu Val Ala Met Asp Phe Ser Gly Gln Lys Thr
 20 25 30
 Arg Val Ile Asp Asn Pro Thr Glu Ala Leu Ser Val Ala Val Glu Glu
 35 40 45
 Gly Leu Ala Trp Arg Lys Lys Gly Cys Leu Arg Leu Gly Asn His Gly
 50 55 60

2

Ser Pro Thr Ala Pro Ser Gln Ser Ser Ala Val Asn Met Ala Leu His
 65 70 75 80

Arg Ser Gln Pro

<210> 3
 <211> 174
 <212> PRT
 <213> Rattus sp.

<400> 3
 Pro Met Arg Ser Val Ser Glu Asn Ser Leu Val Ala Met Asp Phe Ser
 1 5 10 15
 Gly Gln Lys Thr Arg Val Ile Asp Asn Pro Thr Glu Ala Leu Ser Val
 20 25 30
 Ala Val Glu Glu Gly Leu Ala Trp Arg Lys Lys Gly Cys Leu Arg Leu
 35 40 45
 Gly Asn His Gly Ser Pro Thr Ala Pro Ser Gln Ser Ser Ala Val Asn
 50 55 60
 Met Ala Leu His Arg Ser Gln Pro Trp Phe His His Arg Ile Ser Arg
 65 70 75 80
 Asp Glu Ala Gln Gln Leu Ile Thr Arg Gln Gly Pro Val Asp Gly Val
 85 90 95
 Phe Leu Val Arg Asp Ser Gln Ser Asn Pro Arg Thr Phe Val Leu Ser
 100 105 110
 Met Ser His Gly Gln Lys Ile Lys His Phe Gln Ile Ile Pro Val Glu
 115 120 125
 Asp Asp Gly Glu Val Phe His Thr Leu Asp Asp Gly His Thr Lys Phe
 130 135 140
 Thr Asp Leu Ile Gln Leu Val Glu Phe Tyr Gln Leu Asn Lys Gly Val
 145 150 155 160
 Leu Pro Cys Lys Leu Lys His Tyr Cys Ala Arg Met Ala Val
 165 170

<210> 4
 <211> 186
 <212> PRT
 <213> Rattus sp.

<400> 4
 Gln Ala Arg Ser Ala Cys Ser Ser Gln Ser Val Ser Pro Met Arg Ser
 1 5 10 15

3

Val Ser Glu Asn Ser Leu Val Ala Met Asp Phe Ser Gly Gln Lys Thr
 20 25 30
 Arg Val Ile Asp Asn Pro Thr Glu Ala Leu Ser Val Ala Val Glu Glu
 35 40 45
 Gly Leu Ala Trp Arg Lys Lys Gly Cys Leu Arg Leu Gly Asn His Gly
 50 55 60
 Ser Pro Thr Ala Pro Ser Gln Ser Ser Ala Val Asn Met Ala Leu His
 65 70 75 80
 Arg Ser Gln Pro Trp Phe His His Arg Ile Ser Arg Asp Glu Ala Gln
 85 90 95
 Gln Leu Ile Thr Arg Gln Gly Pro Val Asp Gly Val Phe Leu Val Arg
 100 105 110
 Asp Ser Gln Ser Asn Pro Arg Thr Phe Val Leu Ser Met Ser His Gly
 115 120 125
 Gln Lys Ile Lys His Phe Gln Ile Ile Pro Val Glu Asp Asp Gly Glu
 130 135 140
 Val Phe His Thr Leu Asp Asp Gly His Thr Lys Phe Thr Asp Leu Ile
 145 150 155 160
 Gln Leu Val Glu Phe Tyr Gln Leu Asn Lys Gly Val Leu Pro Cys Lys
 165 170 175
 Leu Lys His Tyr Cys Ala Arg Met Ala Val
 180 185

<210> 5
 <211> 43
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 5
 Pro Met Arg Ser Ile Ser Glu Asn Ser Leu Val Ala Met Asp Phe Ser
 1 5 10 15
 Gly Gln Lys Ser Arg Val Ile Glu Asn Pro Thr Glu Ala Leu Ser Val
 20 25 30
 Ala Val Glu Glu Gly Leu Ala Trp Arg Lys Lys
 35 40

<210> 6
 <211> 84
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 6

4

Gln Gly Arg Ser Gly Cys Ser Ser Gln Ser Ile Ser Pro Met Arg Ser
 1 5 10 15
 Ile Ser Glu Asn Ser Leu Val Ala Met Asp Phe Ser Gly Gln Lys Ser
 20 25 30
 Arg Val Ile Glu Asn Pro Thr Glu Ala Leu Ser Val Ala Val Glu Glu
 35 40 45
 Gly Leu Ala Trp Arg Lys Lys Gly Cys Leu Arg Leu Gly Thr His Gly
 50 55 60
 Ser Pro Thr Ala Ser Ser Gln Ser Ser Ala Thr Asn Met Ala Ile His
 65 70 75 80
 Arg Ser Gln Pro

<210> 7
 <211> 174
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 7
 Pro Met Arg Ser Ile Ser Glu Asn Ser Leu Val Ala Met Asp Phe Ser
 1 5 10 15
 Gly Gln Lys Ser Arg Val Ile Glu Asn Pro Thr Glu Ala Leu Ser Val
 20 25 30
 Ala Val Glu Glu Gly Leu Ala Trp Arg Lys Lys Gly Cys Leu Arg Leu
 35 40 45
 Gly Thr His Gly Ser Pro Thr Ala Ser Ser Gln Ser Ser Ala Thr Asn
 50 55 60
 Met Ala Ile His Arg Ser Gln Pro Trp Phe His His Lys Ile Ser Arg
 65 70 75 80
 Asp Glu Ala Gln Arg Leu Ile Ile Gln Gln Gly Leu Val Asp Gly Val
 85 90 95
 Phe Leu Val Arg Asp Ser Gln Ser Asn Pro Lys Thr Phe Val Leu Ser
 100 105 110
 Met Ser His Gly Gln Lys Ile Lys His Phe Gln Ile Ile Pro Val Glu
 115 120 125
 Asp Asp Gly Glu Met Phe His Thr Leu Asp Asp Gly His Thr Arg Phe
 130 135 140
 Thr Asp Leu Ile Gln Leu Val Glu Phe Tyr Gln Leu Asn Lys Gly Val
 145 150 155 160
 Leu Pro Cys Lys Leu Lys His Tyr Cys Ala Arg Ile Ala Leu
 165 170

<210> 8
 <211> 186
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 8
 Gln Gly Arg Ser Gly Cys Ser Ser Gln Ser Ile Ser Pro Met Arg Ser
 1 5 10 15
 Ile Ser Glu Asn Ser Leu Val Ala Met Asp Phe Ser Gly Gln Lys Ser
 20 25 30
 Arg Val Ile Glu Asn Pro Thr Glu Ala Leu Ser Val Ala Val Glu Glu
 35 40 45
 Gly Leu Ala Trp Arg Lys Lys Gly Cys Leu Arg Leu Gly Thr His Gly
 50 55 60
 Ser Pro Thr Ala Ser Ser Gln Ser Ser Ala Thr Asn Met Ala Ile His
 65 70 75 80
 Arg Ser Gln Pro Trp Phe His His Lys Ile Ser Arg Asp Glu Ala Gln
 85 90 95
 Arg Leu Ile Ile Gln Gln Gly Leu Val Asp Gly Val Phe Leu Val Arg
 100 105 110
 Asp Ser Gln Ser Asn Pro Lys Thr Phe Val Leu Ser Met Ser His Gly
 115 120 125
 Gln Lys Ile Lys His Phe Gln Ile Ile Pro Val Glu Asp Asp Gly Glu
 130 135 140
 Met Phe His Thr Leu Asp Asp Gly His Thr Arg Phe Thr Asp Leu Ile
 145 150 155 160
 Gln Leu Val Glu Phe Tyr Gln Leu Asn Lys Gly Val Leu Pro Cys Lys
 165 170 175
 Leu Lys His Tyr Cys Ala Arg Ile Ala Leu
 180 185

<210> 9
 <211> 43
 <212> PRT
 <213> mus muris

<400> 9
 Pro Met Arg Ser Val Ser Glu Asn Ser Leu Val Ala Met Asp Phe Ser
 1 5 10 15
 Gly Gln Ile Gly Arg Val Ile Asp Asn Pro Ala Glu Ala Gln Ser Ala
 20 25 30

Ala Leu Glu Glu Gly His Ala Trp Arg Asn Gly
 35 40

<210> 10
 <211> 82
 <212> PRT
 <213> mus muris

<400> 10
 Pro Gln Arg Lys Gly Leu Pro Pro Pro Phe Asn Ala Pro Met Arg Ser
 1 5 10 15
 Val Ser Glu Asn Ser Leu Val Ala Met Asp Phe Ser Gly Gln Ile Gly
 20 25 30
 Arg Val Ile Asp Asn Pro Ala Glu Ala Gln Ser Ala Ala Leu Glu Glu
 35 40 45
 Gly His Ala Trp Arg Asn Gly Ser Thr Arg Met Asn Ile Leu Ser Ser
 50 55 60
 Gln Ser Pro Leu His Pro Ser Thr Leu Asn Ala Val Ile His Arg Thr
 65 70 75 80
 Gln His

<210> 11
 <211> 172
 <212> PRT
 <213> mus muris

<400> 11
 Pro Met Arg Ser Val Ser Glu Asn Ser Leu Val Ala Met Asp Phe Ser
 1 5 10 15
 Gly Gln Ile Gly Arg Val Ile Asp Asn Pro Ala Glu Ala Gln Ser Ala
 20 25 30
 Ala Leu Glu Glu Gly His Ala Trp Arg Asn Gly Ser Thr Arg Met Asn
 35 40 45
 Ile Leu Ser Ser Gln Ser Pro Leu His Pro Ser Thr Leu Asn Ala Val
 50 55 60
 Ile His Arg Thr Gln His Trp Phe His Gly Arg Ile Ser Arg Glu Glu
 65 70 75 80
 Ser His Arg Ile Ile Lys Gln Gln Gly Leu Val Asp Gly Leu Phe Leu
 85 90 95
 Leu Arg Asp Ser Gln Ser Asn Pro Lys Ala Phe Val Leu Thr Leu Cys
 100 105 110

His His Gln Lys Ile Lys Asn Phe Gln Ile Leu Pro Cys Glu Asp Asp
 115 120 125

Gly Gln Thr Phe Phe Thr Leu Asp Asp Gly Asn Thr Lys Phe Ser Asp
 130 135 140

Leu Ile Gln Leu Val Asp Phe Tyr Gln Leu Asn Lys Gly Val Leu Pro
 145 150 155 160

Cys Lys Leu Lys His His Cys Ile Arg Val Ala Leu
 165 170

<210> 12
 <211> 184
 <212> PRT
 <213> mus muris

<400> 12
 Pro Gln Arg Lys Gly Leu Pro Pro Pro Phe Asn Ala Pro Met Arg Ser
 1 5 10 15

Val Ser Glu Asn Ser Leu Val Ala Met Asp Phe Ser Gly Gln Ile Gly
 20 25 30

Arg Val Ile Asp Asn Pro Ala Glu Ala Gln Ser Ala Ala Leu Glu Glu
 35 40 45

Gly His Ala Trp Arg Asn Gly Ser Thr Arg Met Asn Ile Leu Ser Ser
 50 55 60

Gln Ser Pro Leu His Pro Ser Thr Leu Asn Ala Val Ile His Arg Thr
 65 70 75 80

Gln His Trp Phe His Gly Arg Ile Ser Arg Glu Glu Ser His Arg Ile
 85 90 95

Ile Lys Gln Gln Gly Leu Val Asp Gly Leu Phe Leu Leu Arg Asp Ser
 100 105 110

Gln Ser Asn Pro Lys Ala Phe Val Leu Thr Leu Cys His His Gln Lys
 115 120 125

Ile Lys Asn Phe Gln Ile Leu Pro Cys Glu Asp Asp Gly Gln Thr Phe
 130 135 140

Phe Thr Leu Asp Asp Gly Asn Thr Lys Phe Ser Asp Leu Ile Gln Leu
 145 150 155 160

Val Asp Phe Tyr Gln Leu Asn Lys Gly Val Leu Pro Cys Lys Leu Lys
 165 170 175

His His Cys Ile Arg Val Ala Leu
 180

8

<210> 13
 <211> 43
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 13
 Pro Val Arg Ser Val Ser Glu Asn Ser Leu Val Ala Met Asp Phe Ser
 1 5 10 15
 Gly Gln Thr Gly Arg Val Ile Glu Asn Pro Ala Glu Ala Gln Ser Ala
 20 25 30
 Ala Leu Glu Glu Gly His Ala Trp Arg Lys Arg
 35 40

<210> 14
 <211> 82
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 14
 Gln Gln Arg Lys Ala Leu Leu Ser Pro Phe Ser Thr Pro Val Arg Ser
 1 5 10 15
 Val Ser Glu Asn Ser Leu Val Ala Met Asp Phe Ser Gly Gln Thr Gly
 20 25 30
 Arg Val Ile Glu Asn Pro Ala Glu Ala Gln Ser Ala Ala Leu Glu Glu
 35 40 45
 Gly His Ala Trp Arg Lys Arg Ser Thr Arg Met Asn Ile Leu Gly Ser
 50 55 60
 Gln Ser Pro Leu His Pro Ser Thr Leu Ser Thr Val Ile His Arg Thr
 65 70 75 80
 Gln His

<210> 15
 <211> 172
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 15
 Pro Val Arg Ser Val Ser Glu Asn Ser Leu Val Ala Met Asp Phe Ser
 1 5 10 15
 Gly Gln Thr Gly Arg Val Ile Glu Asn Pro Ala Glu Ala Gln Ser Ala
 20 25 30
 Ala Leu Glu Glu Gly His Ala Trp Arg Lys Arg Ser Thr Arg Met Asn
 35 40 45

Ile Leu Gly Ser Gln Ser Pro Leu His Pro Ser Thr Leu Ser Thr Val
 50 55 60
 Ile His Arg Thr Gln His Trp Phe His Gly Arg Phe Ser Arg Glu Glu
 65 70 75 80
 Ser His Arg Ile Ile Lys Gln Gln Gly Leu Val Asp Gly Leu Phe Leu
 85 90 95
 Leu Arg Asp Ser Gln Ser Asn Pro Lys Ala Phe Val Leu Thr Leu Cys
 100 105 110
 His His Gln Lys Ile Lys Asn Phe Gln Ile Leu Pro Cys Glu Asp Asp
 115 120 125
 Gly Gln Thr Phe Phe Ser Leu Asp Asp Gly Asn Thr Lys Phe Ser Asp
 130 135 140
 Leu Ile Gln Leu Val Asp Phe Tyr Gln Leu Asn Lys Gly Val Leu Pro
 145 150 155 160
 Cys Lys Leu Lys His His Cys Ile Arg Val Ala Leu
 165 170

<210> 16
 <211> 184
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 16
 Gln Gln Arg Lys Ala Leu Leu Ser Pro Phe Ser Thr Pro Val Arg Ser
 1 5 10 15
 Val Ser Glu Asn Ser Leu Val Ala Met Asp Phe Ser Gly Gln Thr Gly
 20 25 30
 Arg Val Ile Glu Asn Pro Ala Glu Ala Gln Ser Ala Ala Leu Glu Glu
 35 40 45
 Gly His Ala Trp Arg Lys Arg Ser Thr Arg Met Asn Ile Leu Gly Ser
 50 55 60
 Gln Ser Pro Leu His Pro Ser Thr Leu Ser Thr Val Ile His Arg Thr
 65 70 75 80
 Gln His Trp Phe His Gly Arg Phe Ser Arg Glu Glu Ser His Arg Ile
 85 90 95
 Ile Lys Gln Gln Gly Leu Val Asp Gly Leu Phe Leu Leu Arg Asp Ser
 100 105 110
 Gln Ser Asn Pro Lys Ala Phe Val Leu Thr Leu Cys His His Gln Lys
 115 120 125
 Ile Lys Asn Phe Gln Ile Leu Pro Cys Glu Asp Asp Gly Gln Thr Phe

10

130 135 140

Phe Ser Leu Asp Asp Gly Asn Thr Lys Phe Ser Asp Leu Ile Gln Leu
 145 150 155 160

Val Asp Phe Tyr Gln Leu Asn Lys Gly Val Leu Pro Cys Lys Leu Lys
 165 170 175

His His Cys Ile Arg Val Ala Leu
 180

<210> 17
 <211> 43
 <212> PRT
 <213> Rattus sp.

<400> 17
 Pro Leu Arg Ser Val Ser Asp Asn Thr Leu Val Ala Met Asp Phe Ser
 1 5 10 15

Gly His Ala Gly Arg Val Ile Asp Asn Pro Arg Glu Ala Leu Ser Ala
 20 25 30

Ala Met Glu Glu Ala Gln Ala Trp Arg Lys Lys
 35 40

<210> 18
 <211> 80
 <212> PRT
 <213> Rattus sp.

<400> 18
 Ser Arg His Leu Arg Leu Ser Tyr Leu Gly Ser Pro Pro Leu Arg Ser
 1 5 10 15

Val Ser Asp Asn Thr Leu Val Ala Met Asp Phe Ser Gly His Ala Gly
 20 25 30

Arg Val Ile Asp Asn Pro Arg Glu Ala Leu Ser Ala Ala Met Glu Glu
 35 40 45

Ala Gln Ala Trp Arg Lys Lys Thr Asn His Arg Leu Ser Leu Pro Thr
 50 55 60

Thr Cys Ser Gly Ser Ser Leu Ser Ala Ala Ile His Arg Thr Gln Pro
 65 70 75 80

<210> 19
 <211> 170

11

<212> PRT

<213> Rattus sp.

<400> 19

Pro Leu Arg Ser Val Ser Asp Asn Thr Leu Val Ala Met Asp Phe Ser
 1 5 10 15

Gly His Ala Gly Arg Val Ile Asp Asn Pro Arg Glu Ala Leu Ser Ala
 20 25 30

Ala Met Glu Glu Ala Gln Ala Trp Arg Lys Lys Thr Asn His Arg Leu
 35 40 45

Ser Leu Pro Thr Thr Cys Ser Gly Ser Ser Leu Ser Ala Ala Ile His
 50 55 60

Arg Thr Gln Pro Trp Phe His Gly Arg Ile Ser Arg Glu Glu Ser Gln
 65 70 75 80

Arg Leu Ile Gly Gln Gln Gly Leu Val Asp Gly Val Phe Leu Val Arg
 85 90 95

Glu Ser Gln Arg Asn Pro Gln Gly Phe Val Leu Ser Leu Cys His Leu
 100 105 110

Gln Lys Val Lys His Tyr Leu Ile Leu Pro Ser Glu Asp Glu Gly Cys
 115 120 125

Leu Tyr Phe Ser Met Asp Glu Gly Gln Thr Arg Phe Thr Asp Leu Leu
 130 135 140

Gln Leu Val Glu Phe His Gln Leu Asn Arg Gly Ile Leu Pro Cys Leu
 145 150 155 160

Leu Arg His Cys Cys Ala Arg Val Ala Leu
 165 170

<210> 20

<211> 182

<212> PRT

<213> Rattus sp.

<400> 20

Ser Arg His Leu Arg Leu Ser Tyr Leu Gly Ser Pro Pro Leu Arg Ser
 1 5 10 15

Val Ser Asp Asn Thr Leu Val Ala Met Asp Phe Ser Gly His Ala Gly
 20 25 30

Arg Val Ile Asp Asn Pro Arg Glu Ala Leu Ser Ala Ala Met Glu Glu
 35 40 45

Ala Gln Ala Trp Arg Lys Lys Thr Asn His Arg Leu Ser Leu Pro Thr
 50 55 60

Thr Cys Ser Gly Ser Ser Leu Ser Ala Ala Ile His Arg Thr Gln Pro

12

65		70		75		80									
Trp	Phe	His	Gly	Arg	Ile	Ser	Arg	Glu	Glu	Ser	Gln	Arg	Leu	Ile	Gly
			85						90					95	
Gln	Gln	Gly	Leu	Val	Asp	Gly	Val	Phe	Leu	Val	Arg	Glu	Ser	Gln	Arg
			100					105					110		
Asn	Pro	Gln	Gly	Phe	Val	Leu	Ser	Leu	Cys	His	Leu	Gln	Lys	Val	Lys
		115					120					125			
His	Tyr	Leu	Ile	Leu	Pro	Ser	Glu	Asp	Glu	Gly	Cys	Leu	Tyr	Phe	Ser
	130					135					140				
Met	Asp	Glu	Gly	Gln	Thr	Arg	Phe	Thr	Asp	Leu	Leu	Gln	Leu	Val	Glu
145					150					155					160
Phe	His	Gln	Leu	Asn	Arg	Gly	Ile	Leu	Pro	Cys	Leu	Leu	Arg	His	Cys
			165					170						175	
Cys	Ala	Arg	Val	Ala	Leu										
			180												

<210> 21
 <211> 43
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 21
 Pro Leu Arg Ser Ala Ser Asp Asn Thr Leu Val Ala Met Asp Phe Ser
 1 5 10 15
 Gly His Ala Gly Arg Val Ile Glu Asn Pro Arg Glu Ala Leu Ser Val
 20 25 30
 Ala Leu Glu Glu Ala Gln Ala Trp Arg Lys Lys
 35 40

<210> 22
 <211> 80
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 22
 Ser Arg His Leu His Pro Ser Cys Leu Gly Ser Pro Pro Leu Arg Ser
 1 5 10 15
 Ala Ser Asp Asn Thr Leu Val Ala Met Asp Phe Ser Gly His Ala Gly
 20 25 30
 Arg Val Ile Glu Asn Pro Arg Glu Ala Leu Ser Val Ala Leu Glu Glu
 35 40 45
 Ala Gln Ala Trp Arg Lys Lys Thr Asn His Arg Leu Ser Leu Pro Met

13

50 55 60
 Pro Ala Ser Gly Thr Ser Leu Ser Ala Ala Ile His Arg Thr Gln Leu
 65 70 75 80

<210> 23
 <211> 170
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 23
 Pro Leu Arg Ser Ala Ser Asp Asn Thr Leu Val Ala Met Asp Phe Ser
 1 5 10 15
 Gly His Ala Gly Arg Val Ile Glu Asn Pro Arg Glu Ala Leu Ser Val
 20 25 30
 Ala Leu Glu Glu Ala Gln Ala Trp Arg Lys Lys Thr Asn His Arg Leu
 35 40 45
 Ser Leu Pro Met Pro Ala Ser Gly Thr Ser Leu Ser Ala Ala Ile His
 50 55 60
 Arg Thr Gln Leu Trp Phe His Gly Arg Ile Ser Arg Glu Glu Ser Gln
 65 70 75 80
 Arg Leu Ile Gly Gln Gln Gly Leu Val Asp Gly Leu Phe Leu Val Arg
 85 90 95
 Glu Ser Gln Arg Asn Pro Gln Gly Phe Val Leu Ser Leu Cys His Leu
 100 105 110
 Gln Lys Val Lys His Tyr Leu Ile Leu Pro Ser Glu Glu Glu Gly Arg
 115 120 125
 Leu Tyr Phe Ser Met Asp Asp Gly Gln Thr Arg Phe Thr Asp Leu Leu
 130 135 140
 Gln Leu Val Glu Phe His Gln Leu Asn Arg Gly Ile Leu Pro Cys Leu
 145 150 155 160
 Leu Arg His Cys Cys Thr Arg Val Ala Leu
 165 170

<210> 24
 <211> 182
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 24
 Ser Arg His Leu His Pro Ser Cys Leu Gly Ser Pro Pro Leu Arg Ser

14

1 5 10 15
 Ala Ser Asp Asn Thr Leu Val Ala Met Asp Phe Ser Gly His Ala Gly
 20 25 30
 Arg Val Ile Glu Asn Pro Arg Glu Ala Leu Ser Val Ala Leu Glu Glu
 35 40 45
 Ala Gln Ala Trp Arg Lys Lys Thr Asn His Arg Leu Ser Leu Pro Met
 50 55 60
 Pro Ala Ser Gly Thr Ser Leu Ser Ala Ala Ile His Arg Thr Gln Leu
 65 70 75 80
 Trp Phe His Gly Arg Ile Ser Arg Glu Glu Ser Gln Arg Leu Ile Gly
 85 90 95
 Gln Gln Gly Leu Val Asp Gly Leu Phe Leu Val Arg Glu Ser Gln Arg
 100 105 110
 Asn Pro Gln Gly Phe Val Leu Ser Leu Cys His Leu Gln Lys Val Lys
 115 120 125
 His Tyr Leu Ile Leu Pro Ser Glu Glu Glu Gly Arg Leu Tyr Phe Ser
 130 135 140
 Met Asp Asp Gly Gln Thr Arg Phe Thr Asp Leu Leu Gln Leu Val Glu
 145 150 155 160
 Phe His Gln Leu Asn Arg Gly Ile Leu Pro Cys Leu Leu Arg His Cys
 165 170 175
 Cys Thr Arg Val Ala Leu
 180

<210> 25
 <211> 43
 <212> PRT
 <213> mus muris

<400> 25
 Pro Leu Arg Ser Val Ser Asp Asn Thr Leu Val Ala Met Asp Phe Ser
 1 5 10 15
 Gly His Ala Gly Arg Val Ile Asp Asn Pro Arg Glu Ala Leu Ser Ala
 20 25 30
 Ala Met Glu Glu Ala Gln Ala Trp Arg Lys Lys
 35 40

<210> 26
 <211> 80
 <212> PRT
 <213> mus muris

15

<400> 26

Ser Arg His Leu Arg Leu Ser Tyr Leu Gly Ser Pro Pro Leu Arg Ser
 1 5 10 15

Val Ser Asp Asn Thr Leu Val Ala Met Asp Phe Ser Gly His Ala Gly
 20 25 30

Arg Val Ile Asp Asn Pro Arg Glu Ala Leu Ser Ala Ala Met Glu Glu
 35 40 45

Ala Gln Ala Trp Arg Lys Lys Thr Asn His Arg Leu Ser Leu Pro Thr
 50 55 60

Thr Cys Ser Gly Ser Ser Leu Ser Ala Ala Ile His Arg Thr Gln Pro
 65 70 75 80

<210> 27

<211> 170

<212> PRT

<213> mus muris

<400> 27

Pro Leu Arg Ser Val Ser Asp Asn Thr Leu Val Ala Met Asp Phe Ser
 1 5 10 15

Gly His Ala Gly Arg Val Ile Asp Asn Pro Arg Glu Ala Leu Ser Ala
 20 25 30

Ala Met Glu Glu Ala Gln Ala Trp Arg Lys Lys Thr Asn His Arg Leu
 35 40 45

Ser Leu Pro Thr Thr Cys Ser Gly Ser Ser Leu Ser Ala Ala Ile His
 50 55 60

Arg Thr Gln Pro Trp Phe His Gly Arg Ile Ser Arg Glu Glu Ser Gln
 65 70 75 80

Arg Leu Ile Gly Gln Gln Gly Leu Val Asp Gly Val Phe Leu Val Arg
 85 90 95

Glu Ser Gln Arg Asn Pro Gln Gly Phe Val Leu Ser Leu Cys His Leu
 100 105 110

Gln Lys Val Lys His Tyr Leu Ile Leu Pro Ser Glu Asp Glu Gly Cys
 115 120 125

Leu Tyr Phe Ser Met Asp Glu Gly Gln Thr Arg Phe Thr Asp Leu Leu
 130 135 140

Gln Leu Val Glu Phe His Gln Leu Asn Arg Gly Ile Leu Pro Cys Leu
 145 150 155 160

16

Leu Arg His Cys Cys Ala Arg Val Ala Leu
 165 170

<210> 28
 <211> 182
 <212> PRT
 <213> mus muris

<400> 28
 Ser Arg His Leu Arg Leu Ser Tyr Leu Gly Ser Pro Pro Leu Arg Ser
 1 5 10 15
 Val Ser Asp Asn Thr Leu Val Ala Met Asp Phe Ser Gly His Ala Gly
 20 25 30
 Arg Val Ile Asp Asn Pro Arg Glu Ala Leu Ser Ala Ala Met Glu Glu
 35 40 45
 Ala Gln Ala Trp Arg Lys Lys Thr Asn His Arg Leu Ser Leu Pro Thr
 50 55 60
 Thr Cys Ser Gly Ser Ser Leu Ser Ala Ala Ile His Arg Thr Gln Pro
 65 70 75 80
 Trp Phe His Gly Arg Ile Ser Arg Glu Glu Ser Gln Arg Leu Ile Gly
 85 90 95
 Gln Gln Gly Leu Val Asp Gly Val Phe Leu Val Arg Glu Ser Gln Arg
 100 105 110
 Asn Pro Gln Gly Phe Val Leu Ser Leu Cys His Leu Gln Lys Val Lys
 115 120 125
 His Tyr Leu Ile Leu Pro Ser Glu Asp Glu Gly Cys Leu Tyr Phe Ser
 130 135 140
 Met Asp Glu Gly Gln Thr Arg Phe Thr Asp Leu Leu Gln Leu Val Glu
 145 150 155 160
 Phe His Gln Leu Asn Arg Gly Ile Leu Pro Cys Leu Leu Arg His Cys
 165 170 175
 Cys Ala Arg Val Ala Leu
 180

TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS


PCT

REC'D 26 JUN 2001

WIPO PCT

RAPPORT D'EXAMEN PRELIMINAIRE INTERNATIONAL

(article 36 et règle 70 du PCT)

Référence du dossier du déposant ou du mandataire BLObs644/41 PCT	POUR SUITE A DONNER voir la notification de transmission du rapport d'examen préliminaire international (formulaire PCT/IPEA/416)	
Demande internationale n° PCT/FR00/00613	Date du dépôt international (jour/mois/année) 14/03/2000	Date de priorité (jour/mois/année) 15/03/1999
Classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois classification nationale et CIB G01N33/74		
Déposant CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE-CNRS		
<p>1. Le présent rapport d'examen préliminaire international, établi par l'administration chargée de l'examen préliminaire international, est transmis au déposant conformément à l'article 36.</p> <p>2. Ce RAPPORT comprend 9 feuilles, y compris la présente feuille de couverture.</p> <p><input type="checkbox"/> Il est accompagné d'ANNEXES, c'est-à-dire de feuilles de la description, des revendications ou des dessins qui ont été modifiées et qui servent de base au présent rapport ou de feuilles contenant des rectifications faites auprès de l'administration chargée de l'examen préliminaire international (voir la règle 70.16 et l'instruction 607 des Instructions administratives du PCT).</p> <p>Ces annexes comprennent feuilles.</p>		
<p>3. Le présent rapport contient des indications relatives aux points suivants:</p> <ul style="list-style-type: none"> I <input checked="" type="checkbox"/> Base du rapport II <input checked="" type="checkbox"/> Priorité III <input type="checkbox"/> Absence de formulation d'opinion quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle IV <input type="checkbox"/> Absence d'unité de l'invention V <input checked="" type="checkbox"/> Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration VI <input type="checkbox"/> Certains documents cités VII <input checked="" type="checkbox"/> Irrégularités dans la demande internationale VIII <input checked="" type="checkbox"/> Observations relatives à la demande internationale 		
Date de présentation de la demande d'examen préliminaire internationale 04/10/2000	Date d'achèvement du présent rapport 22.06.2001	
Nom et adresse postale de l'administration chargée de l'examen préliminaire international:  Office européen des brevets D-80298 Munich Tél. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Fonctionnaire autorisé Stricker, J-E N° de téléphone +49 89 2399 8395	

**RAPPORT D'EXAMEN
PRÉLIMINAIRE INTERNATIONAL**

Demande internationale n° PCT/FR00/00613

I. Base du rapport

1. En ce qui concerne les **éléments** de la demande internationale (*les feuilles de remplacement qui ont été remises à l'office récepteur en réponse à une invitation faite conformément à l'article 14 sont considérées dans le présent rapport comme "initialement déposées" et ne sont pas jointes en annexe au rapport puisqu'elles ne contiennent pas de modifications (règles 70.16 et 70.17)*):

Description, pages:

1-11 version initiale

Revendications, N°:

1-7 version initiale

Dessins, feuilles:

1/7-7/7 version initiale

Partie de la demande réservée au listage des séquences, pages:

1-16, telles que initialement déposées

2. En ce qui concerne la **langue**, tous les éléments indiqués ci-dessus étaient à la disposition de l'administration ou lui ont été remis dans la langue dans laquelle la demande internationale a été déposée, sauf indication contraire donnée sous ce point.

Ces éléments étaient à la disposition de l'administration ou lui ont été remis dans la langue suivante: , qui est :

- ☐ la langue d'une traduction remise aux fins de la recherche internationale (selon la règle 23.1(b)).
- ☐ la langue de publication de la demande internationale (selon la règle 48.3(b)).
- ☐ la langue de la traduction remise aux fins de l'examen préliminaire internationale (selon la règle 55.2 ou 55.3).

3. En ce qui concerne les **séquences de nucléotides ou d'acide aminés** divulguées dans la demande internationale (le cas échéant), l'examen préliminaire internationale a été effectué sur la base du listage des séquences :

- ☒ contenu dans la demande internationale, sous forme écrite.
- ☒ déposé avec la demande internationale, sous forme déchiffrable par ordinateur.
- ☐ remis ultérieurement à l'administration, sous forme écrite.
- ☐ remis ultérieurement à l'administration, sous forme déchiffrable par ordinateur.
- ☐ La déclaration, selon laquelle le listage des séquences par écrit et fourni ultérieurement ne va pas au-delà de la divulgation faite dans la demande telle que déposée, a été fournie.

**RAPPORT D'EXAMEN
PRÉLIMINAIRE INTERNATIONAL**

Demande internationale n° PCT/FR00/00613

- ☒ La déclaration, selon laquelle les informations enregistrées sous déchiffrable par ordinateur sont identiques à celles du listage des séquences Présenté par écrit, a été fournie.

4. Les modifications ont entraîné l'annulation :

- ☐ de la description, pages :
☐ des revendications, n°s :
☐ des dessins, feuilles :

5. ☐ Le présent rapport a été formulé abstraction faite (de certaines) des modifications, qui ont été considérées comme allant au-delà de l'exposé de l'invention tel qu'il a été déposé, comme il est indiqué ci-après (règle 70.2(c)) :

(Toute feuille de remplacement comportant des modifications de cette nature doit être indiquée au point 1 et annexée au présent rapport)

6. Observations complémentaires, le cas échéant :

II. Priorité

1. ☐ Le présent rapport a été formulée comme si aucune priorité n'avait été revendiquée, du fait que les documents suivants n'ont pas été remis dans le délai prescrit :
- ☐ copie de la demande antérieure dont la priorité a été revendiquée.
- ☐ traduction de la demande antérieure dont la priorité a été revendiquée.
2. ☐ Le présent rapport a été formulée comme si aucune priorité n'avait été revendiquée, du fait que la revendication de la priorité a été jugée non valable.

Pour les besoins du présent rapport, la date de dépôt international indiquée plus haut est donc considérée comme la date pertinente.

3. Observations complémentaires, le cas échéant :
voir feuille séparée

V. Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration

1. Déclaration

Nouveauté	Oui : Revendications 1-7
	Non : Revendications aucune
Activité inventive	Oui : Revendications aucune
	Non : Revendications 1-7
Possibilité d'application industrielle	Oui : Revendications 1-7
	Non : Revendications aucune

**RAPPORT D'EXAMEN
PRÉLIMINAIRE INTERNATIONAL**

Demande internationale n° PCT/FR00/00613

2. Citations et explications
voir feuille séparée

VII. Irrégularités dans la demande internationale

Les irrégularités suivantes, concernant la forme ou le contenu de la demande internationale, ont été constatées :
voir feuille séparée

VIII. Observations relatives à la demande internationale

Les observations suivantes sont faites au sujet de la clarté des revendications, de la description et des dessins et de la question de savoir si les revendications se fondent entièrement sur la description :
voir feuille séparée

**RAPPORT D'EXAMEN
PRELIMINAIRE INTERNATIONAL - FEUILLE SEPARÉE**

Demande internationale n° PCT/FR00/00613

Section II

La date de priorité de la présente demande est valablement revendiquée en ce qui concerne l'utilisation du récepteur de l'insuline et de fragments constitués par les domaines PIR ou PIR-SH2 de Grb14 ou Grb10 (cf. exemples 2 et 3, Figs 7 et 8 du document de priorité).

Par contre, la date de priorité de la présente demande n'est pas valablement revendiquée en ce qui concerne l'utilisation d'un fragment constitué par le domaine PIR ou PIR-SH2 de Grb7. Seule l'utilisation de la protéine Grb7 entière est décrite dans le document de priorité (cf. exemple 1).

La date de priorité de la présente demande est valablement revendiquée en ce qui concerne les séquences SEQ ID NO: 2, 6 et 14 ainsi que leur utilisation. Ces séquences correspondent aux SEQ ID NO: 1, 2 et 3 de la Fig.4 du document de priorité.

La date de priorité n'est pas valablement revendiquée en ce qui concerne les séquences SEQ ID NO: 1, 3-5, 7-13 et 15-28 ainsi que leur utilisation.

Section V

Il est fait référence aux documents suivants:

D1: US-A-5 840 536

D2: US-A-5 726 027

D3: WO 98 01475 A

D4: A KASUS-JACOBI, D PERDEREAU, C AUZAN, E CLAUSER, E VAN OBBERGHEN, F MAUVAIS-JARVIS, J GIRARD, A-F BURNOL: 'Identification of the Rat Adapter Grb14 as an Inhibitor of Insulin Actions' JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 273, no. 40, 2 octobre 1998 (1998-10-02), pages 26026-26035, XP002124253 cité dans la demande

D5: W HE, D W ROSE, J M OLEFSKY, T A GUSTAFSON: 'Grb10 Interacts Differentially with the

RAPPORT D'EXAMEN

Demande internationale n° PCT/FR00/00613

PRELIMINAIRE INTERNATIONAL - FEUILLE SEPAREE

Insulin Receptor, Insulin-like Growth Factor I Receptor, and Epidermal Growth Factor Receptor via the Grb10 Src Homology (SH2) Domain and a Second Novel Domain Located between the Pleckstrin Homology and SH2 Domains' JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 273, no. 12, 20 mars 1998 (1998-03-20), pages 6860-6867, XP002124256 cité dans la demande.

D6: US-A-5 889 150

1. Le document D2 (cf. résumé et revendication) décrit un procédé de criblage de molécules affectant la liaison de la protéine tyrosine phosphatase (PTP1B) au récepteur de l'insuline activé.

L'objet des revendications 1 et 3 de la présente demande diffère de D2 en ce qu'on utilise un fragment constitué par le domaine PIR ou le domaine PIR-SH2 d'une protéine de la famille des protéines Grb7, à la place de la PTP1B. Le procédé de la revendication 3 diffère en outre en ce que l'on détermine la modulation de l'activité tyrosine kinase du récepteur de l'insuline.

Les procédés de criblage des documents D1 et D3 font quant à eux intervenir GrbIR-1 (isoforme de Grb10) et des effecteurs cellulaires ("cellular binding partner"), sans que ces derniers comprennent le récepteur de l'insuline (cf. dans D1, c.3, l.11-54; c.10, l.42-65; c.12, l.8-49 et dans D3, revendications 17-20; p.19, l.8-11 et p.22, l.22-p.24, l.2). D1 et D3 ne mentionnent pas les domaines PIR ou PIR-SH2.

L'objet des revendications 1 et 3 de la présente demande diffère donc de D1 et D3 en ce qu'on utilise un fragment constitué par le domaine PIR ou le domaine PIR-SH2 d'une protéine de la famille des protéines Grb7 à la place de GrbIR-1. Le procédé de la revendication 3 diffère en outre en ce que l'on utilise le récepteur de l'insuline.

L'objet des revendications 1 et 3 est donc nouveau (Art. 33(2) PCT).

2. Le problème que se propose de résoudre la revendication 1 peut être considéré comme l'utilisation d'autres composés pour le criblage de molécules destinées au traitement des maladies impliquant l'insuline.

La solution proposée dans ladite revendication n'est pas considérée comme

inventive (article 33(3) PCT) pour les raisons suivantes:

Les documents D4 (résumé, Fig. 2A et discussion) et D5 (résumé, Figs. 2, 3 et 7; PIR est ici dénommé BPS) montrent que PIR et PIR-SH2 sont les domaines responsables de l'interaction entre Grb14, respectivement Grb10, et le récepteur de l'insuline et qu'une région de 43 aa est hautement conservée au sein de Grb14, Grb7 et Grb10 (cf. e.g. D4, p.26030, colonne de droite, 3è. paragraphe).

L'utilisation des domaines PIR ou PIR-SH2 pour le criblage de molécules destinées au traitement des maladies impliquant l'insuline semble donc être une démarche évidente et souhaitable pour l'homme du métier.

Les séquences de la revendication 2 (voir aussi p.4, l.32 à p.5, l.1 de la présente demande) n'impliquent pas d'activité inventive puisque les domaines PIR, PIR-SH2 et la région conservée de 43 aa étaient identifiés et que leur fonction était connue dans l'état antérieur de la technique (D4, D5, supra, infra et en particulier la Fig. 2 de D5; D4, p.26030, c.2, 3è §).

3. Le problème que se propose de résoudre la revendication 3 peut être considéré comme la mise au point d'un procédé de détection de molécules aptes à moduler l'activité tyrosine kinase du récepteur de l'insuline.

La solution proposée dans ladite revendication n'est pas considérée comme inventive (article 33(3) PCT) pour les raisons suivantes:

D4 et D5, rédigés par deux équipes de recherche différentes, proposent que l'interaction entre le récepteur de l'insuline et Grb10 ou Grb14 module l'activité tyrosine kinase de ce récepteur (cf. les quatre derniers paragraphes de D4 et le dernier paragraphe de D5). Au vu des arguments présentés ci-dessus, il semble évident et désirable à l'homme du métier d'utiliser le récepteur de l'insuline activé, le domaine PIR, sa partie conservée ou PIR-SH2 et de mesurer l'activité tyrosine kinase dudit récepteur.

Les revendications dépendantes 4 et 5 ne contiennent aucune caractéristique qui définisse un objet qui satisfasse aux exigences du PCT en ce qui concerne

l'activité inventive (revendication 4: cf. dernier § du point 2 ci-dessus; revendication 5: étant donné que l'interaction fragment - récepteur est bien caractérisée dans l'état de la technique, cette étape de présélection semble relever d'une démarche ordinaire pour l'homme du métier).

4. Il semble que l'objet de la revendication 6 ne soit pas décrit dans l'état antérieur de la technique. Cet objet serait donc nouveau (art. 33(2) PCT).

Le criblage d'agonistes et d'antagonistes d'une protéine de la famille des protéines Grb7 capables de moduler l'activité tyrosine kinase du récepteur de l'insuline ne semble pas inventif (revendications 1-5, cf. points 2 et 3 ci-dessus). Un composé capable de se lier à PIR ou PIR-SH2 et d'inhiber l'activité tyrosine kinase du récepteur est donc l'une des molécules recherchées. Il est évident que le but d'un tel criblage est en premier lieu d'identifier des molécules utilisables pour la fabrication d'un médicament utile dans le traitement des maladies impliquant l'insuline.

Il semble donc que objet des revendications 6 et 7 n'implique pas d'activité inventive.

5. Remarque: D4 et D5 décrivent respectivement l'interaction de Grb14 et Grb10 avec le récepteur de l'insuline. Etant donné l'homologie connue avec Grb7 (en particulier celle des domaines PIR et PIR-SH2 et de la région hautement conservée), l'homme du métier peut extrapoler les résultats obtenus avec Grb14 et Grb10 (état antérieur de la technique) à Grb7 ou à la famille des protéines Grb7 avec une espérance raisonnable de réussite.

6. La date de priorité n'est pas valablement revendiquée pour certains aspects de la présente demande (cf. section II ci-dessus).

Le document P,X (D6) cité dans le rapport de recherche fait donc partie de l'état antérieur de la technique en ce qui concerne lesdits aspects.

Néanmoins D6 (cf. exemple X c.51-53) ne mentionne ni ne rend évident l'utilisation

- de fragments constitués par le domaine PIR ou le domaine PIR-SH2 d'une protéine de la famille des protéines Grb7 ni celle
- du récepteur de l'insuline.

D6 ne semble donc pas préjudiciable à la nouveauté et à l'activité inventive de l'objet des revendications de la présente demande.

Section VII

Contrairement à ce qu'exige la règle 5.1 a) ii) PCT, la description n'indique pas l'état de la technique antérieure pertinent exposé dans le document D2 et ne cite pas ce document.

Section VIII

L'expression "détermination de l'effet de la molécule" au point 6) de la revendication 5 est vague et équivoque, et laisse un doute quant à la signification des caractéristiques techniques auxquelles elle se réfère.

L'objet de ladite revendication n'est donc pas clairement défini (article 6 PCT).

L'insertion de "inhibition ou stimulation de l'interaction fragment-récepteur" (cf. p.6, l.31-32 mais sans les parenthèses) permettrait de remédier à ce manque de clarté.

Translation

09/936697

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

TECH CENTER 1800/2900

MAR 07 2002

RECEIVED

Applicant's or agent's file reference BLOjp64441EX	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/FR00/00613	International filing date (day/month/year) 14 March 2000 (14.03.00)	Priority date (day/month/year) 15 March 1999 (15.03.99)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC G01N 33/74, 33/566, 33/573		
Applicant CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE-CNRS		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.

2. This REPORT consists of a total of 9 sheets, including this cover sheet.

☐ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of _____ sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☒ Priority
- III ☐ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☐ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI ☐ Certain documents cited
- VII ☒ Certain defects in the international application
- VIII ☒ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 04 October 2000 (04.10.00)	Date of completion of this report 22 June 2001 (22.06.2001)
Name and mailing address of the IPEA/EP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/FR00/00613

I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of (Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.):

☐ the international application as originally filed.

☒ the description, pages 1-11, as originally filed,
pages _____, filed with the demand,
pages _____, filed with the letter of _____,
pages _____, filed with the letter of _____.

☒ the claims, Nos. 1-7, as originally filed,
Nos. _____, as amended under Article 19,
Nos. _____, filed with the demand,
Nos. _____, filed with the letter of _____,
Nos. _____, filed with the letter of _____.

☐ the drawings, sheets/fig 1/7-7/7, as originally filed,
sheets/fig _____, filed with the demand,
sheets/fig _____, filed with the letter of _____,
sheets/fig _____, filed with the letter of _____.

2. The amendments have resulted in the cancellation of:

☐ the description, pages _____

☐ the claims, Nos. _____

☐ the drawings, sheets/fig _____

3. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

4. Additional observations, if necessary:

Sequence listing part of the application, pages: 1-16 as
originally filed

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/FR 00/00613

Supplemental Box

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: II.

The priority date of the present application is validly claimed as regards the use of the insulin receptor and of fragments consisting of the Grb14 or Grb10 PIR or PIR-SH2 domains (cf. Examples 2 and 3, Figures 7 and 8 of the priority document).

However, the priority date of the present application is not validly claimed as regards the use of a fragment consisting of the Grb7PIR or PIR-SH2 domain. The priority document only describes the use of the whole Grb7 protein (cf. Example 1).

The priority date of the present application is validly claimed as regards sequences SEQ ID NO. 2, 6 and 14, and the use thereof. Said sequences correspond to SEQ ID NO. 1, 2 and 3 of Figure 4 of the priority document.

The priority date of the present application is not validly claimed as regards sequences SEQ ID NO. 1, 3-5, 7-13 and 15-28, as well as the use thereof.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/FR 00/00613

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-7	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims		YES
	Claims	1-7	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-7	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

Reference is made to the following documents:

D1: US-A-5 840 536

D2: US-A-5 726 027

D3: WO 98 01475 A

D4: A KASUS-JACOBI, D PERDEREAU, C AUZAN, E CLAUSER, E VAN OBBERGHEN, F MAUVAIS-JARVIS, J GIRARD, A-F BURNOL:

'Identification of the Rat Adapter Grb14 as an Inhibitor of Insulin Actions', JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 273, no. 40, 2 October 1998 (1998-10-02), pages 26026-26035, XP002124253, cited in the application.

D5: W HE, D W ROSE, J M OLEFSKY, T A GUSTAFSON: 'Grb10 interacts Differentially with the Insulin Receptor, Insulin-like Growth Factor I Receptor, and Epidermal Growth Factor Receptor via the Grb10 Src Homology (SH2) Domain and a Second Novel Domain Located between the Pleckstrin Homology and SH2 Domains', JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 273, no. 12, 20 March 1998 (1998-03-20), pages 6860-6867, XP002124256, cited in the application.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/FR 00/00613

D6: US-A-5 889 150.

1. Document D2 (cf. abstract and claim) describes a method for screening molecules affecting the binding of protein tyrosine phosphatase (PTP1B) with the activated insulin receptor.

The subject matter of Claims 1 and 3 of the present application differs from D2 in that a fragment consisting of the PIR or PIR-SH2 domain of a protein of the Grb7 family is used instead of PTP1B. The method of Claim 3 further differs therefrom in that the modulation of the insulin receptor tyrosine kinase activity is determined.

As for the screening methods of documents D1 and D3, these use GrbIR-1 (Grb10 isoform) and cellular effectors ("cellular binding partner") which do not include the insulin receptor (cf. D1, Column 3, lines 11-54; Column 10, lines 42-65; Column 12, lines 8-49; and D3, Claims 17-20; page 19, lines 8-11 and page 22, lines 22-24; line 2). D1 and D3 do not mention the PIR or PIR-SH2 domains.

The subject matter of Claim 1 and 3 of the present application therefore differs from D1 in that a fragment consisting of the PIR or PIR-SH2 domain of a protein of the Grb7 family is used instead of GrbIR-1. The method of Claim 3 further differs therefrom in that the insulin receptor is used.

The subject matter of Claims 1 and 3 is therefore novel (PCT Article 33(2)).

2. The problem that Claim 1 proposes to solve can be

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/FR 00/00613

considered to be that of using other compounds to screen molecules for treating insulin-mediated disorders.

The solution proposed in said claim is not considered to be inventive (PCT Article 33(3)) for the following reasons:

Documents D4 (summary, Figure 2A and discussion) and D5 (summary, Figures 2, 3 and 7; PIR is here designated BPS) demonstrate that the PIR and PIR-SH2 domains are responsible for the interaction between Grb14 and/or Grb10 and the insulin receptor, and that a 43 aa region is highly conserved within Grb14, Grb7 and Grb10 (cf. e.g. D4, page 26030, right-hand column, 3rd paragraph).

The use of the PIR or PIR-SH2 domains for screening molecules for treating insulin-mediated disorders therefore appears to be an obvious and desirable measure for a person skilled in the art.

The sequences of Claim 2 (see also page 4, line 32 to page 5, line 1 of the present application) do not involve an inventive step, since the PIR, PIR-SH2 domains and the conserved 43 aa region had been identified and the function thereof was known in the prior art (D4, D5, supra, infra and in particular Figure 2 of D5; D4, page 26030, Column 2, 3rd paragraph).

3. The problem that Claim 3 aims to solve can be considered to be that of providing a method for identifying molecules capable of modulating insulin receptor tyrosine kinase activity.

The solution proposed in said claim is not considered inventive (PCT Article 33(3)) for the following reasons:

D4 and D5, which are written by two different research teams, suggest that the interaction between the insulin receptor and Grb10 or Grb14 modulates the tyrosine kinase activity of said receptor (cf. the last four paragraphs of D4 and the last paragraph of D5). In view of the above arguments, it appears obvious and desirable for a person skilled in the art to use the activated insulin receptor, the PIR domain, the conserved portion thereof or PIR-Sh2 and to measure the tyrosine kinase activity of said receptor.

Dependent Claims 4 and 5 do not contain any feature defining subject matter which meets the PCT requirements with respect to inventive step (Claim 4: cf. last paragraph of point 2 above; Claim 5; since the fragment/receptor interaction is indeed characterised in the prior art, this preselection step appears to be an ordinary measure for a person skilled in the art).

4. It appears that the subject matter of Claim 6 is not described in the prior art. Therefore, said subject matter is novel (PCT Article 33(2)).

Screening of agonists and antagonists of a protein of the Grb7 family capable of modulating insulin receptor tyrosine kinase activity does not appear to be inventive (Claims 1-5, cf. points 2 and 3 above). A compound capable of binding to PIR or PIR-SH2 and

of inhibiting the tyrosine kinase activity of the receptor is therefore one of the molecules sought. It is obvious that the aim of such a screening is, primarily, to identify molecules useful for preparing a drug for treating insulin-mediated disorders.

Therefore, it appears that the subject matter of Claims 6 and 7 does not involve an inventive step.

5. Note: D4 and D5 respectively describe the interaction between Grb14 and Grb10 and the insulin receptor. In view of the known homology with Grb7 (in particular that of the PIR and PIR-SH2 domains and of the highly conserved region), a person skilled in the art would be able to extrapolate the results obtained with Grb14 and Grb10 (prior art) to Grb7 or the family of Grb7 proteins with a reasonable expectation of success.
6. The priority date is not validly claimed as regards certain aspects of the present application (cf. Box II above).

The P,X document (D6) cited in the search report therefore forms part of the prior art for said aspects.

Nevertheless, D6 (Example X, Columns 51-53) does not mention or suggest in an obvious manner the use

- of fragments consisting of the PIR or PIR-SH2 domain of a protein of the Grb7 protein family, nor that
- of the insulin receptor.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/FR 00/00613

D6 therefore appears to be prejudicial to the novelty and inventive step of the subject matter of the claims of the present application.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/FR 00/00613

VII. Certain defects in the international application

The following defects in the form or contents of the international application have been noted:

Contrary to the requirements of PCT Rule 5.1(a)(ii), the description does not outline the relevant prior art set forth in document D2 and does not cite this document.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/FR 00/00613

VIII. Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

The expression "determining the effect of the molecule", point 6) of Claim 5, is vague and ambiguous, and casts doubt as to the meaning of the technical features to which it refers.

Therefore, the subject matter of said claim has not been clearly defined (PCT Article 6).

The insertion of the phrase "inhibiting or stimulating fragment/receptor interaction" (cf. page 6, lines 31-32, but without the parentheses), would rectify this lack of clarity.

TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

NOTIFICATION D'ELECTION

(règle 61.2 du PCT)

Expéditeur: le BUREAU INTERNATIONAL

Destinataire:

Commissioner
US Department of Commerce
United States Patent and Trademark
Office, PCT
2011 South Clark Place Room 524
Arlington, VA 22202
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

en sa qualité d'office élu

Date d'expédition (jour/mois/année) 27 octobre 2000 (27.10.00)	
Demande internationale no PCT/FR00/00613	Référence du dossier du déposant ou du mandataire BLOjp64441EX
Date du dépôt international (jour/mois/année) 14 mars 2000 (14.03.00)	Date de priorité (jour/mois/année) 15 mars 1999 (15.03.99)
Déposant BURNOL, Anne-Françoise etc	

1. L'office désigné est avisé de son élection qui a été faite:

☒ dans la demande d'examen préliminaire international présentée à l'administration chargée de l'examen préliminaire international le:

04 octobre 2000 (04.10.00)

☐ dans une déclaration visant une élection ultérieure déposée auprès du Bureau international le:

2. L'élection ☒ a été faite

☐ n'a pas été faite

avant l'expiration d'un délai de 19 mois à compter de la date de priorité ou, lorsque la règle 32 s'applique, dans le délai visé à la règle 32.2b).

Bureau international de l'OMPI
34, chemin des Colombettes
1211 Genève 20, Suisse

no de télécopieur: (41-22) 740.14.35

Fonctionnaire autorisé

Antonia Muller

no de téléphone: (41-22) 338.83.38

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter

Application No

PCT/FR 00/00613

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 G01N33/74 G01N33/566 G01N33/573

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data

BEST AVAILABLE COPY

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 5 840 536 A (DUNNINGTON DAMIEN J ET AL) 24 November 1998 (1998-11-24) column 3, line 9 - line 54	1-7
Y	US 5 726 027 A (OLEFSKY JERROLD M) 10 March 1998 (1998-03-10) abstract	1-7
Y	WO 98 01475 A (DUNNINGTON DAMIEN J ; SHOELSON STEVEN E (US); SMITHKLINE BEECHAM CO) 15 January 1998 (1998-01-15) claims 17-20	1-7



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"G" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

5 July 2000

Date of mailing of the international search report

12/07/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Hart-Davis, J

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 00/00613

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>A KASUS-JACOBI, D PERDEREAU, C AUZAN, E CLAUSER, E VAN OBBERGHEN, F MAUVAIS-JARVIS, J GIRARD, A-F BURNOL: "Identification of the Rat Adapter Grb14 as an Inhibitor of Insulin Actions" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 273, no. 40, 2 October 1998 (1998-10-02), pages 26026-26035, XP002124253 cited in the application the whole document</p>	1-7
Y	<p>T J O'NEILL, D W ROSE, T S PILLAY, K HOTTA, J M OLEFSKY, T A GUSTAFSON: "Interaction of a GRB-IR Splice Variant (a Human GRB10 Homolog) with the Insulin and Insulin-like Growth Factor I Receptors" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 271, no. 37, 13 September 1996 (1996-09-13), pages 22506-22513, XP002124254 cited in the application the whole document</p>	1-7
Y	<p>R J DALY, G M SANDERSON, P W JAMES, R L SUTHERLAND: "Cloning and Characterization of GRB14, a Novel Member of the GRB7 Gene Family" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 271, no. 21, 24 May 1996 (1996-05-24), pages 12502-12510, XP002124255 cited in the application the whole document</p>	1-7
Y	<p>W HE, D W ROSE, J M OLEFSKY, T A GUSTAFSON: "Grb10 Interacts Differentially with the Insulin Receptor, Insulin-like Growth Factor I Receptor, and Epidermal Growth Factor Receptor via the Grb10 Src Homology (SH2) Domain and a Second Novel Domain Located between the Pleckstrin Homology and SH2 Domains" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 273, no. 12, 20 March 1998 (1998-03-20), pages 6860-6867, XP002124256 cited in the application the whole document</p>	1-7

BEST AVAILABLE COPY

-/--

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No

PCT/FR 00/00613

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 7 G01N33/74 G01N33/566 G01N33/573

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 G01N

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

EPO-Internal, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie °	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y ✓	US 5 840 536 A (DUNNINGTON DAMIEN J ET AL) 24 novembre 1998 (1998-11-24) colonne 3, ligne 9 - ligne 54 ---	1-7
Y ✓	US 5 726 027 A (OLEFSKY JERROLD M) 10 mars 1998 (1998-03-10) abrégé ---	1-7
Y ✓	WO 98 01475 A (DUNNINGTON DAMIEN J ; SHOELSON STEVEN E (US); SMITHKLINE BEECHAM CO) 15 janvier 1998 (1998-01-15) revendications 17-20 --- -/--	1-7

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

° Catégories spéciales de documents cités:

"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent

"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date

"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)

"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens

"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

5 juillet 2000

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

12/07/2000

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Hart-Davis, J

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Descriptive Internationale No
PCT/FR 00/00613

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y ✓	<p>A KASUS-JACOBI, D PERDEREAU, C AUZAN, E CLAUSER, E VAN OBBERGHEN, F MAUVAIS-JARVIS, J GIRARD, A-F BURNOL: "Identification of the Rat Adapter Grb14 as an Inhibitor of Insulin Actions" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 273, no. 40, 2 octobre 1998 (1998-10-02), pages 26026-26035, XP002124253 cité dans la demande le document en entier</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1-7
Y ✓	<p>T J O'NEILL, D W ROSE, T S PILLAY, K HOTTA, J M OLEFSKY, T A GUSTAFSON: "Interaction of a GRB-IR Splice Variant (a Human GRB10 Homolog) with the Insulin and Insulin-like Growth Factor I Receptors" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 271, no. 37, 13 septembre 1996 (1996-09-13), pages 22506-22513, XP002124254 cité dans la demande le document en entier</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1-7
Y ✓	<p>R J DALY, G M SANDERSON, P W JANES, R L SUTHERLAND: "Cloning and Characterization of GRB14, a Novel Member of the GRB7 Gene Family" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 271, no. 21, 24 mai 1996 (1996-05-24), pages 12502-12510, XP002124255 cité dans la demande le document en entier</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1-7
Y ✓	<p>W HE, D W ROSE, J M OLEFSKY, T A GUSTAFSON: "Grb10 Interacts Differentially with the Insulin Receptor, Insulin-like Growth Factor I Receptor, and Epidermal Growth Factor Receptor via the Grb10 Src Homology (SH2) Domain and a Second Novel Domain Located between the Pleckstrin Homology and SH2 Domains" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 273, no. 12, 20 mars 1998 (1998-03-20), pages 6860-6867, XP002124256 cité dans la demande le document en entier</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1-7

-/--

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No
PCT/FR 00/00613

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	<p>✓ J D FRANTZ, S GIORGETTI-PERALDI, E A OTTINGER, S E SHOELSON: "Human GRB-IRbeta/GRB10" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 272, no. 5, 31 janvier 1997 (1997-01-31), pages 2659-2667, XP002124257 cité dans la demande le document en entier</p> <p style="text-align: center;">----</p>	1-7
P, X	<p>✓ US 5 889 150 A (MARGOLIS BENJAMIN L ET AL) 30 mars 1999 (1999-03-30) colonne 51 -colonne 53: exemple 10</p> <p style="text-align: center;">----</p>	1-7
A	<p>✓ F LIU, R A ROTH: "Grb-IR: A SH2-domain-containing protein that binds to the insulin receptor and inhibits its function" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, vol. 92, octobre 1995 (1995-10), pages 10287-10291, XP002124258 cité dans la demande le document en entier</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 00/00613

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	J D FRANTZ, S GIORGETTI-PERALDI, E A OTTINGER, S E SHOELSON: "Human GRB-IRbeta/GRB10" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 272, no. 5, 31 January 1997 (1997-01-31), pages 2659-2667, XP002124257 cited in the application the whole document ----	1-7
P,X	US 5 889 150 A (MARGOLIS BENJAMIN L ET AL) 30 March 1999 (1999-03-30) column 51 -column 53; example 10 ----	1-7
A	F LIU, R A ROTH: "Grb-IR: A SH2-domain-containing protein that binds to the insulin receptor and inhibits its function" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, vol. 92, October 1995 (1995-10), pages 10287-10291, XP002124258 cited in the application the whole document -----	1-7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 00/00613

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5840536	A	24-11-1998	NONE	
US 5726027	A	10-03-1998	AU 1967897 A WO 9732595 A	22-09-1997 12-09-1997
WO 9801475	A	15-01-1998	AU 6450696 A	02-02-1998
US 5889150	A	30-03-1999	US 5434064 A US 5618691 A US 5677421 A US 5858686 A AT 187772 T AU 667803 B AU 1234692 A CA 2100860 A DE 69230433 D EP 0567567 A JP 6505561 T MX 9200246 A PT 100037 A,B WO 9213001 A	18-07-1995 08-04-1997 14-10-1997 12-01-1999 15-01-2000 18-04-1996 27-08-1992 19-07-1992 20-01-2000 03-11-1993 23-06-1994 31-03-1994 31-03-1993 06-08-1992